

Винахід стосується області імуномодуляції і являє собою подальші розробки в області терапевтичних вакцин на основі пухлинних клітин, які, головним чином, засновані на таких передумовах: існуванні якісної і кількісної різниці між пухлинними і нормальними клітинами; на тому, що імунна система має принципову властивість розпізнавати цю різницю; на тому, що імунна система може бути стимульована (за допомогою імунізації за допомогою вакцин) для розпізнавання пухлинних клітин на основі цієї різниці.

Для того, щоб домогтися протипухлинної реакції, потрібно виконати, щонайменше дві умови. По-перше, необхідно експримувати антиген проти пухлинних клітин, який не зустрічається в нормальних клітинах або зустрічається обмежено, для того, щоб стала можливим якісна різниця між нормальною тканиною і тканиною пухлини. По-друге, потрібно відповідно активізувати імунну систему, щоб вона реагувала на цей антиген. Істотне утруднення в імунотерапії пухлин перебуває в незначній імуногенності, насамперед людини. На ранніх етапах виявляють антигени, що асоціюються з пухлинами і специфічні для пухлин, які являють собою нео-епітопи і можуть бути потенційними цілями для атаки імунної системи. Якщо імунній системі не вдається усунути пухлини, які експримують ці нео-епітопи, то це пояснюється недостатністю імунної відповіді на нео-антиген, а не є недоліками нео-епітопів.

В імунотерапії раку на клітинній основі розвиваються дві загальні стратегії: з одного боку, адаптивна імунотерапія, яка використовує розвиток *in vitro* реактивних у відношенні пухлини Т-лімфоцитів і їх повторне введення пацієнтам; з іншого боку, активна імунотерапія, що використовує пухлинні клітини, в очікуванні викликати або нову, або посилену імунну відповідь, яка приведе до системної відповіді пухлини. Протипухлинні вакцини на основі активної імунотерапії одержують різними способами; прикладом є опромінені пухлинні клітини, які заміщаються допоміжними імуностимулюючими засобами, такими як *Corynebacterium parvum* або *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), щоб викликати імунну реакцію на антиген пухлини (Oettgen і Old, 1991).

Останнім часом в активній імунотерапії проти раку використовують генетично модифіковані пухлинні клітини. Огляд різних спроб відчуження пухлинних клітин шляхом посилення імуногенності за рахунок введення різних генів дається в Zatloukal і ін., 1993. Один з раніше відомих напрямків передбачає використання пухлинних клітин, які генетично модифікуються для продукування цитокіну.

Ідентифікування й ізолювання антигенів пухлини й асоційованих із пухлиною антигенів (Tas), а також пептидів, що виділяються з них, (наприклад, описані в Wolfe і ін., 1994a і 1994b; Carrel і ін. 1993, Lehman і ін., 1989, Tib-bets і ін. 1993, або описані в різних опублікованих міжнародних заявках WO 92/20356, WO 94/05304 WO 94/23031, WO 95/00159) є передумовою розробки подальшого напрямку застосування антигенів пухлини в якості імуногенів для вакцин проти пухлини, причому як у вигляді білків, так і у вигляді пептидів. З робіт Boon і ін., 1992; Boon і ін., 1994; Boon і ін., 1995; van Peel і ін. 1995; Van der Eynde, 1995 відомо, що злоякісну меланому представляють пептиди, що виділяються з пухлинних антигенів, у МНС-1-відношенні. За допомогою протипухлинної вакцини, що представляє собою антигени пухлини як такі, дотепер не була досягнута імуногенність, достатня для того, щоб викликати клітинну імунну відповідь, яка потрібна для знищення пухлинних клітин, що містять антиген пухлини (Marchand і ін., 1995). Для досягнення того, щоб клітини, що представляють антиген ("Antigenpresenting cells", "APCs"), несли на своїй поверхні певний пептидний антиген, пропонувалося "додати пульсацію" пептидам, що в результаті приводить до наповнення клітин пептидами (Tukocinski і ін., 1996). Було також відзначено, що спільне застосування допоміжних засобів лише відносно підсилює імунну відповідь (Oettgen і Old, 1991).

Третій напрямок в активній імунотерапії, що ставить завдання посилення ефективності протипухлинних вакцин, базується на коеногізованих (відчужених) пухлинних клітинах. Ця концепція заснована на передумові, що імунна система реагує на пухлинні клітини, які експримують сторонній білок, і в зв'язку з цим реагуванням визивається імунна відповідь проти тих антигенів, які поставляються пухлинними клітинами вакцини.

Центральну роль у регулюванні специфічної імунної відповіді грає тримолекулярний комплекс, що складається з компонентів: антиген-рецептора Т-клітини, МНС (Major-Histocompatibility Complex)-молекули і її лігандів, і є пептидним фрагментом, виділеним із білка.

МНС-молекули (і відповідні молекули HLAs) являють собою пептид-рецептори, які при обов'язковій специфічності забезпечують зв'язування багатьох різних лігандів. Передумовою цього є алей-специфічні пептидні мотиви, які виявляють такі критерії специфічності: пептиди мають певну довжину, в залежності від МНС-гаплотипу, для МНС-1-гаплотипу, як правило, від восьми до десяти амінокислотних залишків. Звичайно дві з позицій амінокислотних залишків утворюють так називаний "анкер", який через одну амінокислоту або через амінокислотний залишок оточений близько-спорідненими бічними ланцюгами. Точне положення анкерних амінокислот у пептиді і вимоги до їх властивостей варіюються в залежності від МНС-гаплотипів. С-термін пептидних лігандів являє собою часто аліфатичний або заряджений залишок. Такі МНС-пептид-лігандні компоненти відомі дотепер стосовно до H-2K^d, K^b, K^c, K^{kn}, D^b, HLA-A*0201, A*0205 і B*2705 гаплотипам.

У рамках білкового обміну всередині клітини невинроджені, винроджені і сторонні генні компоненти, наприклад, вірусні білки або антигени пухлини, розкладаються на дрібні пептиди, деякі з яких являють собою потенційні ліганди для МНС-молекул. Цим створюється передумова для їхнього пред'явлення через МНС-молекули, наслідком чого є клітинна імунна відповідь, причому, зокрема ще не до кінця вияснено, яким чином пептиди виробляються в клітині в якості МНС-лігандів. Сторонні або відчужені білки і їх фрагменти можуть бути розпізнані, зв'язані й усунути за допомогою імуноглобуліну, що представляє імунну відповідь. Це стосується також всіх антигенів пухлини: на прикладі антигенів MUC1, CEA і HER2/новий, що асоціюються з пухлинами, доведено, що імуноглобуліни, які проявляють себе специфічно щодо цих білків, можуть розпізнавати й умиртвляти клітини, що містять білок. Щоб викликати специфічний пухлинно-антигенну імунну відповідь були випробувані різні форми MUC1 і CEA в якості імуногенів (наприклад, у рекомбінованих поксвекторах; Bronte і ін., журнал Immunol. 154: 5282, 1995) у дослідях на тваринних і при попередніх випробуваннях.

У рамках запропонованого винаходу були продовжені міркування, використовувані при розробках клітинної протипухлинної вакцини: у той час, коли незлоякісні, нормальні клітини організму допускаються імунною системою, організм реагує на нормальну клітину, якщо вона, наприклад, на основі вірусної інфекції синтезує сторонні білки з імунотаксисом. Причиною цього є те, що МНС-молекули представляють сторонні пептиди, які відносяться до сторонніх білків організму. Як наслідок імунотаксиста відзначає, що з цією клітиною відбувається щось небажане, чужорідне. APCs (сюди відносяться макрофаги, дендритні клітини, клітини Лангерганса, В-клітини, а також, можливо, недавно відкриті біфенотипові клітини, які виявляють властивості як В-клітин, так і макрофагів; Tuckowski et al., 1996) активуються, генерують новий специфічний імунітет і елімінують клітину.

Пухлинні клітини містять відповідні специфічні для пухлини антигени пухлини, які не є достатньою вакциною, тому що на підставі їх незначної імунотаксиста ігноруються імунною системою. Якщо пухлинна клітина навантажена не стороннім білком, а стороннім пептидом, то додатково до сторонніх пептидів також і власні антигени пухлини цієї клітини сприймаються як сторонні. У результаті такого відчуження за допомогою пептиду можна досягти того, що викликана сторонніми пептидами клітинна імунна відповідь буде звернена проти антигенів пухлини.

Причина незначної імунотаксиста пухлинних клітин може бути не тільки якісною, але і кількісною проблемою. Для пептиду, одержаного від антигену пухлини, це може означати, що він поданий МНС-молекулами, однак у концентрації, що є незначною, щоб викликати клітинну специфічну для пухлини імунну відповідь.

Збільшення кількості специфічних для пухлини пептидів на пухлинній клітині повинно сприяти відчуженню пухлинної клітини, що веде до клітинної імунної відповіді. Було запропоновано антиген пухлини або одержаний із нього пептид представити на поверхні клітини, щоб він передавався за допомогою ДНК, що кодує відповідний білок або пептиду, як описано в міжнародних заявках WO 92/20356, WO 94/05303, WO 94/23031 і WO 95/00159.

У німецькій заявці на патент Р 19543649.0 представлена клітинна вакцина, що містить в якості активного компонента пухлинні клітини, навантажені одним або декількома пептидами таким чином, що пухлинні клітини разом із пептидами розпізнаються імунною системою індивідуума як сторонні, тому що вони можуть бути з одного боку "сторонніми пептидами" або "ксенопептидами" - це значить, що вони відмінні від пептидів, отриманих від білків, які експримовані пухлинними клітинами індивідуума. Інша категорія пептидів отримана від антигенів пухлини, які експримовані клітинами індивідуума. Ці пептиди іншої категорії сприяють підвищенню імунотаксиста внаслідок того, що вони існують на пухлинних клітинах вакцини в концентрації, яка вище, ніж концентрація тих же пептидів на пухлинних клітинах індивідуума.

В основі запропонованого винаходу лежить задача створити нову лікарську композицію, зокрема, вакцину з імунотаксисним ефектом.

У розвитку концепції клітинної вакцини, опублікованої в німецькій заявці на патент Р 19543649.0, у рамках запропонованого винаходу розглядається лікарська композиція, що містить пептиди з імунотаксисною дією не з клітинами, а в сполученні з допоміжним засобом, щоб викликати або підсилити клітинну і/або гуморальну, переважно системну імунну відповідь, на патогенні збудники або антипухлинну реакцію або викликати толерантність проти білків з аутоімунною дією.

Несподівано було встановлено, що певні допоміжні засоби, наприклад, полікатиони, про які стало відомо в 1965 році, можуть сприяти переносу білків у клітинах (Ryser et al., 1965; Ryser et al., 1978; Shen et al., 1981), підвищують імунотаксиста пептидів.

Винахід стосується лікарської композиції, що містить один або більш пептидів з імунотаксисною дією, білки і фрагменти білка в сполученні з допоміжним засобом. Композиція відрізняється тим, що допоміжний засіб має здатність збільшувати ступінь зв'язування пептиду, білка або фрагмента білка з клітинами організму підлягаючого лікуванню індивідуума або збільшувати ступінь проникнення в клітини і сприяти посиленню імунотаксисного ефекту пептидів, білків або фрагментів білків.

Надалі для стислості пептиди з імунотаксисною дією, білки або фрагменти білка будуть позначені як "пептиди". Термін "пептид", якщо він не стосується безпосередньо лігандів, може тимчасово позначати фрагменти білків або білки, від яких отриманий пептид, або являє собою продукт клітинного розпаду. Під "імунотаксисною дією" розуміється виникнення або посилення клітинної і/або гуморальної, переважно системної, імунної відповіді. У цій формі реального втілення лікарська композиція, згідно з винаходом, діє як вакцина. У кращій формі виконання пептиди є лігандами для, щонайменше, однієї МНС-молекули, яка експримується організмом підлягаючого лікуванню індивідуума.

МНС-молекули людини, відповідно до міжнародних традицій, надалі будуть позначені як "HLA" (Антиген лейкоцита людини).

Під "клітинною імунною відповіддю" варто розуміти, насамперед, цитотоксичний Т-клітинний імунітет, який внаслідок генерування цитотоксичних CD8-позитивних Т-клітин і CD4-позитивних помічників-Т-клітин сприяє руйнуванню пухлинних клітин або клітин, уражених патогенним збудником.

Під "гуморальною імунною відповіддю" варто розуміти виробітку імуніглобулінів, які селективно розпізнають пухлинні клітини або структури, створені патогенними збудниками, і, надалі, разом з іншими системами, як наприклад, доповнення, ADCC (Цитотоксичність, що залежить від антитіл) або фагоцитоз, сприяють руйнуванню цих пухлинних клітин, патогенних збудників або уражених ними клітин.

Пептид, що міститься у вакцині, одержують від антигену або він являє собою, у випадку з білком, антиген, проти якого повинна бути викликана клітинна і/або гуморальна імунна відповідь. Цим досягається той результат, що Т-клітини розпізнають відповідно інші цитотоксичні ефекторні клітини, що містять збудник хвороби, пухлинні клітини, що містять антиген, і/або генерують антитіла.

Для імунізації проти збудників хвороб, таких як бактерії, віруси, паразити, застосовують білки або пептиди, що являють собою білок відповідного збудника або отримані від нього. Насамперед, для цієї мети підходять білки, що залишаються неушкодженими високими мутаційними скупченнями цих збудників.

Наприклад, HPV16/17 (Human Papilloma Vims; Feltkamp і ін., 1995); Hepatitis B Virus Core Antigen (Vitiello і ін., 1995), Plasmo-dium Bergehu (Widmann і ін. 1992), Influenzavirus-Nukleoprotein/ Hepatic C Virus.

Реальним втіленням винаходу є білок, що сприяє виникненню протипухлинної реакції, антиген пухлини або пептид, отриманий від антигену пухлини; при цьому в якості протипухлинної вакцини використовують лікарську композицію. У випадку терапевтичного використання вакцини пептид одержують від антигену пухлини, який експримований пухлинними клітинами індивідуума. Цими антигенами пухлини є, наприклад, такі антигени, які експримовані організмом індивідуума в такій незначній концентрації, що пухлинні клітини не розпізнаються як сторонні.

Антигени пухлини індивідуума можуть бути визначені стандартними методами в ході встановлення діагнозу і виробітки терапевтичних мір: антигени пухлини можуть бути виявлені самим простим способом - імуногістохімічним за допомогою антитіл. Якщо антигенами пухлини є ферменти, наприклад тиразінази, вони можуть бути виявлені за допомогою ферментних досліджень. Для визначення антигенів пухлини з відомою послідовністю може бути притягнутий RT-PCR-метод (Boon, T., і ін. 1994; Coulie, P., і ін. 1994; Weynants, P., і ін., 1994). Подальшими методами виявлення антигенів пухлини є дослідження на базі CTLs із специфікою, що відповідає обумовленим антигенам пухлини. Дослідження такого роду були описані Herin і ін., 1987; Coulie і ін., 1993; Cox і ін., 1994; Rivoltini і ін., 1995; Kawakami і ін., 1995, а також у міжнародній заявці WO 94/14459. З цих джерел запозичені різні антигени пухлини або отримані від них пептидні епітопи, які застосовні в рамках запропонованого винаходу. Приклади використовуваних антигенів пухлини приведені в недавно опублікованих оглядових статтях авторів Rosenberg, 1996 і Henderson Finn, 1996.

Щодо використовуваних антигенів пухлини даний винахід не підлягає обмеженню.

Протипухлинна вакцина, що містить антиген пухлини або отриманий від нього пептид, може використовуватися не тільки для терапевтичних, але і для профілактичних цілей. При профілактичному застосуванні доцільно призначати суміш пептидів, отриманих від представників антигенів пухлини, що часто зустрічаються. При терапевтичному застосуванні протипухлинної вакцини використовують один або більш пептидів, причому вважають, що вони присутні в антигенах пухлини індивідуума. Протипухлинна вакцина, згідно з винаходом, у порівнянні з клітинною вакциною має ту перевагу, що вона корисна індивідуумові на відносно ранній стадії (стадія 1 і 11) захворювання, коли ще не можна одержати досить пухлинних клітин для виготовлення клітинної вакцини.

У кращому реальному втіленні винаходу пептид, через виникнення клітинної імунної відповіді, погодиться з МНС-I- або МНС-II-підтипами індивідуума, що вакцинується. Таким чином пептид виявляє або містить послідовність, яка забезпечує його зв'язування з МНС-молекулою.

Інше реальне втілення лікарської композиції у вигляді протипухлинної вакцини містить, крім всього іншого, поліпептид, що має імуностимулюючу дію, зокрема, цитокін. У кращій формі реального втілення винаходу в якості цитокіну використовують інтерлейкін 2(IL-2) або GM-CSF, наприклад, у дозуванні біля 1000 одиниць; інші приклади для цитокіну: IL-4, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , TNF- α , а також їх сполучення, наприклад, IL-2+IFN- γ , IL-2+IL-4, IL-2+ TNF- α або TNF- α +IFN- γ .

Лікарська композиція у реальному втіленні згідно з винаходом служить цілі досягнення усталеності щодо білків або фрагментів білків, які викликають аутоімунноіндуковані захворювання, тобто використовується для терапії аутоімунних захворювань. Пептиди, використовувані в цій реальній формі втілення винаходу, отримані від білків, які викликають аутоімунні захворювання.

На протипухлинну протипухлинну вакцину винаходу в якості протипухлинної вакцини або в якості вакцини проти патогенних збудників, при якій пептиди сполучаються з ділянкою вихідного білка (пухлинний антиген або білок патогенного збудника), власне кажучи, таким чином, що пептид розпізнається в якості "оригінального антигену", при реалізації даного винаходу для лікування аутоімунних захворювань і інших подібних захворювань використовують пептиди, які виявляють щодо амінокислотної послідовності вихідного білка критичні відмінності. Ці пептиди на основі їх анкерних позицій зв'язані з МНС-молекулою, однак виявляють у своїй послідовності мутації, які є причиною того, що вони функціонують в якості антагоністів, що знову відключають активовані специфічні Т-клітини (Kerch і Alien, 1996).

У якості пептидних антагоністів підходять як натуральні антагоністи, виявлені у вірусах (Bertoletti і ін., 1994), так і антагоністи, які були знайдені в результаті систематичних досліджень, наприклад, завдяки просіванню пептидних бібліотек. Прикладом пептидних антагоністів є пептиди, які здатні відключати Т-клітини, специфічні для білка Myelin Basic. Вони були випробувані на ефективність в експериментах на тваринних (Brocke, 1996).

Пептид, який повинний викликати клітинну імунну відповідь, повинен бути зв'язаний із МНС-молекулою. Щоб мати як наслідок імунну відповідь в організмі індивідуума, індивідуум, що піддається лікуванню, повинен мати у своєму організмі відповідну HLA-молекулу. Визначення HLA-підтипу індивідуума являє собою, стосовно до виникнення клітинної імунної відповіді, одну з істотних передумов для ефективного використання пептиду для даного індивідуума.

HLA-підтип пацієнта може бути визначений стандартними методами, наприклад, тестом на мікролімфотоксичність (Практична імунологія, 1989). Цей тест заснований на принципі, при якому ізолювані з крові пацієнта лімфоцити змішують із лікувальною сироваткою або з моноклональним антитілом проти визначеної HLA-молекули, у присутності доповнення (C) кролика. Позитивні клітини розчиняються і здатні прийняти барвник індикатора, у той час як непошкоджені клітини залишаються незабарвленими.

Для визначення HLA-I або HLA-II-гаплотипу індивідуума може бути також притягнута RT-PCR ("Revers Transcriptase Polymerase Chain Reaction") (Curr. глави 2 і 15). Для здійснення цього дослідження у індивідуума беруть кров і ізолюють із неї РНК. Цю РНК піддають зворотному перетворенню, внаслідок чого виникає кДНК індивідуума. кДНК служить матрицею для полімерної ланцюгової реакції з вихідними парами, які специфічно викликають збільшення DNA-фрагмента, що відповідає певному HLA-гаплотипу. Якщо після агаростручального електрофорезу з'являється ДНК-смуга, організм індивідуума експримує відповідну HLA-молекулу. Якщо смуга на виникає, пацієнт у цьому відношенні негативний.

Визначення використовуюваного згідно з винаходом пептиду за допомогою HLA-молекули відбувається відносно його анкерних амінокислот і його довжини; встановлені анкерні позиції і довжина гарантують, що пептид вписується в пептидну сполучну борозну відповідної HLA-молекули індивідуума. Наслідком цього є стимулювання імунної системи і виникнення клітинної імунної відповіді, яка, у випадку використання отриманого від пухлинного антигену пептиду, спрямована проти пухлинних клітин індивідуума.

Пептиди, використовувані в рамках запропонованого винаходу, присутні в значній по ширині смузі. Їх послідовність може бути отримана від імуногенних білків природного походження або їх продуктів клітинного розпаду, наприклад від вірусних або бактеріальних пептидів, від пухлинних антигенів; вони можуть бути також антагоністами пептидів, отриманих від білків, індукованих від аутоімунних захворювань.

Відповідні пептиди можуть бути підібрані на основі відомих із літератури пептидних послідовностей.

У разі виникнення клітинної імунної відповіді можуть бути визначені пептиди, наприклад на основі пептидів, отриманих від імуногенних білків різного походження (описаних стосовно до різних HLA-мотивів авторами Rammensee і ін., 1993, Rammensee і ін., 1995, Falk і ін., 1991) і які вписуються в сполучну борозну молекул відповідного HLA-підтипу.

Для пептидів, що виявляють часткову послідовність білка з імуногенною дією, на основі уже відомих або при необхідності ще встановлюваних поліпептидних послідовностей, за допомогою корекції послідовностей з урахуванням HLA-специфічних вимог може бути встановлено, які пептиди представляють відповідних кандидатів. Приклади відповідних пептидів можна знайти, наприклад, у Rammensee і ін., 1993, Falk і ін., 1991, і Rammensee, 1995, а також у міжнародній заявці WO 91/09869 (HIV-пептиди); пептиди, отримані від пухлинних антигенів, описані в опублікованих міжнародних заявках на патент WO 95/00159, WO 94/05304. Посилання даються на бібліографічні джерела і на статті, що цитуються в зв'язку з розглянутою проблемою. До кращих кандидатів відносяться пептиди, імуногенність яких уже виявлена, тобто пептиди, отримані від відомих імуногенів, наприклад, вірусних або бактеріальних білків.

Замість використання оригінальних пептидів, які підходять до сполучних борозен MHC-I- або MHC-II молекул, тобто пептидів, отриманих незмінними від білків природного походження за допомогою встановлених мінімальних вимог щодо анкерних позицій і довжини на основі послідовності оригінальних пептидів, можуть бути зроблені зміни, якщо в результаті цих змін буде не тільки не знижена, але переважно посилена ефективна імуногенність пептиду, яка перебуває в його сполучній хімічній спорідненості з MHC-молекулою і його здатності стимулювати рецептори Т-клітин. У цьому випадку, згідно з винаходом, використовують пептиди штучного походження, які синтезують відповідно до вимог їх здатності зв'язуватися з MHC-молекулою. Так, наприклад, виходячи з H2-K^d-ліганд *Ley Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile* (LFEAIEGFI) можуть бути змінені амінокислоти, що не є анкерними амінокислотами, щоб одержати пептид послідовності *Phe Phe Ha Gly Ala Leu Glu Glu He* (FFIGALEEI); крім того, анкерна амінокислота *He* у позиції 9 може бути замінена на *Leu*. Виявлення збітнів MHC-I- або MHC-II-ліганд або їх варіацій може бути досягнуте відповідно до методики, описаної в Rammensee і ін., 1995. Довжина пептиду відповідає, у випадку його узгодження з MHC-I молекулою, переважно мінімальній послідовності від 8 до 10 амінокислот із необхідними анкерними амінокислотами. MHC-II-сполучний мотив, який поширюється на нові амінокислоти, виявляє підвищений ступінь виродження в анкерних позиціях. Недавно на основі рентгеноструктурного аналізу MHC-II-молекул були розроблені методики, що роблять можливим точний аналіз MHC-II-сполучних мотивів і, виходячи з цього, варіацій пептидних послідовностей (Rammensee і ін., 1995 і оригінальні бібліографічні джерела, що цитуються там).

При необхідності, пептид може бути подовжений на C-і/або на T-термін, оскільки таке подовження не порушує здатності пептиду зв'язуватися з MHC-молекулою і оскільки подовжений пептид може на клітинному рівні реагувати на мінімальну послідовність.

У реальному втіленні винаходу пептид заряджений негативно. Завдяк цьому, пептид може бути подовжений негативно зарядженими амінокислотами або негативно заряджені амінокислоти можуть бути впроваджені в пептид переважно в позиціях, що не є необхідними для розпізнавання через специфічні CTLs, або в якості анкерних амінокислот для досягнення електростатичного зв'язування пептиду з полікатіонним допоміжним засобом, таким як полілізін.

У реальному втіленні винаходу антиген є присутнім не у формі пептиду, а у формі білка, фрагмента білка або суміші білків або білкових фрагментів. У рамках запропонованого винаходу використовують великі фрагменти білків або цілі білки, від яких можна гарантовано очікувати, що вони після застосування APCs пацієнта перетворюються в пептиди, які підходять MHC-молекулі.

Білок являє собою антиген або пухлинний антиген, від якого зроблені осколки, що зберігаються після перетворення. У цій формі реального втілення винаходу допоміжний засіб служить цілі уможливити або підсилити напругу клітин, особливо APCs як дендритних клітин або макрофагів, пухлинними антигенами або фрагментами. Сприймані в такий спосіб білки або фрагменти білків перетворюються клітинами і можуть, відповідно з цим, бути подані в MHC-відповідності імуноефектних клітин і, таким чином, викликають або підсилюють імунну відповідь (Braciale і Braciale, 1991; Kovacsócs Bankavski і Rock, 1995; York und Rock, 1996).

Реальне втілення винаходу, у якому білки або великі фрагменти білків введені в якості антигенів, має ту перевагу, що зберігається незначна залежність від HLA-типу індивідуума, тому що білок розпадається на велику кількість осколків і в такий спосіб стає можливим зміна у великому діапазоні "підходящих" форм пептиду.

У випадку введення білків або фрагментів білків можна підтвердити ідентичність перетворених кінцевих продуктів за допомогою хімічного аналізу (розщеплення по Едману або мас-спектрометрія перетворених фрагментів; див. огляд статтю Rammensee і ін., 1995, а також бібліографічні джерела, що цитуються в ній.) або біологічних випробувань (здатність APCs до стимулювання Т-клітин, що є специфічними для перетворених фрагментів).

Вибір пептидних кандидатів, здатних викликати клітинну імунну відповідь, здійснюють традиційно в

декілька етапів. В цілому кандидатів перевіряють за допомогою теста, насамперед, на їх здатність зв'язуватися з МНС-молекулою.

Використовуваний при цьому метод дослідження заснований на здатності пептидів стабілізувати пусті МНС-молекули, як це описано, наприклад, у Stuber і ін., 1994, і McIntyre і ін., 1996. При цьому пептид наноситься на клітини, здатні експримувати відповідну МНС-молекулу, але не зв'язуючі внаслідок генетичного дефекту ендегенні пептиди у МНС-відповідності. Відповідними клітинними лініями цього типу є RMA-S (миші) і T2 (людини) або їх варіанти, що трансформуються. У такий спосіб можуть бути виявлені тільки стабілізовані від відповідного пептиду МНС-молекули. Це досягається переважно за допомогою FACS-аналізу, який заснований на проточній цитометрії (Flow Cytometry, 1989; FACS Vantage TM Users Guide, 1994, Cell Quest TM User's Guide, 1994). Стабільні МНС-молекули виявляються підходящим анти-МНС-антитілом і другим (наприклад, поліклональним) антитілом, яке містить флуоресцентним барвником, наприклад, FITC (Fluorescein isothiocyanate). Лазером певної довжини хвилі в потоці стимулюють окремі клітини; вимірюють флуоресценцію, що випромінюється і яка залежить від кількості пептидів, зв'язаних із клітиною.

Іншим методом визначення зв'язаної з клітиною кількості пептидів є Scatchard-Plot, як описано в Sette і ін., 1994. Для цієї цілі використовують пептид, позначений, наприклад, 125 I. Цей пептид інкубують протягом ночі з ізольованими або отриманими рекомбінантними МНС-молекулами при температурі 4°C при по-різному дефінованих концентраціях пептиду. Для визначення неспецифічної взаємодії пептиду в деяких випробуваннях додають надлишок немічених пептидів, які паралізують неспецифічну взаємодію мічених пептидів. Потім неспецифічно зв'язаний пептид видаляють, наприклад, за допомогою гелієвої хроматографії. Кількість зв'язаних пептидів визначають, у сцинтиляційному лічильнику на основі емітованої радіоактивності. Обробку отриманих даних здійснюють стандартними методами.

Огляд методів для характеристики МНС/пептидної взаємодії, аналізу МНС-ліганд і пептидних сполучних випробувань, здійснюваних у рамках запропонованого винаходу, можна знайти в Rammensee і ін. 1995.

На наступному етапі пептидні кандидати з хорошою якістю зчеплення перевіряють на їх імуногенність.

Виникнення клітинної імунної відповіді може бути підтверджене шляхом визначення пептидоспецифічного CTLs, наприклад, за допомогою методу, описаного в Current Protocols in Immunology, розділ 3, або в Blomberg і ін., 1993. Інше визначення наявності клітинної імунної відповіді дається тоді, коли при відсутності Т-клітин у піддослідній тварини (що досягається шляхом лікування тварини антитілами, які зміщують CD4- або CD8-клітини) не виникає імунна відповідь (Current Protocols in Immunology, Розділ 3).

Клітинна імунна відповідь може бути виявлена також шляхом визначення реакції "затриманої надчутливості" - DTH-реакції у імунізованих тварин. Для цього в підшкірну лапу миші упорскують пептиди, після чого вимірюють ступінь припухлості місця ін'єкції (Grohman і ін., 1995; Puccetti та інш., 1994).

Індукція гуморальної імунної відповіді за допомогою пептидів, що є сторонніми організму антигенами, які експримовані підлягаючим лікуванню організмом у незначній концентрації, може бути визначена шляхом виявлення специфічних антитіл у сироватці. Для визначення титру антитіла в сироватці використовують Enzyme Linked Immunoassay (ELISA). При цьому специфічні антитіла визначають по їх зв'язуванню з використовуваним для імунізації пептидом за допомогою кольорової реакції. Альтернативним методом є Western Blot. При цьому специфічні антитіла сироватки зв'язані з (мобілізованим на мембрані пептидом). Зв'язані антитіла на закінчення знову підтверджуються кольоровою реакцією (посилання на обидва методи приведені в Current Protocols in Immunology. Редактор Coligan і ін., 1991).

Насамперед після вакцинавання за допомогою чужорідних антигенів, наприклад, вірусного походження, варто очікувати утворення антитіл. Не виключено, що специфічні антитіла можуть бути утворені замість мутованих або переекспримованих пептидів, отриманих від клітинних пухлинних антигенів. Руйнування пухлини такими антитілами може відбуватися після зв'язування антитіл із пухлинними клітинами за допомогою інших компонентів імунної системи. В якості інших компонентів можуть бути використані, наприклад, цитотоксичність (ADCC), що залежить від антитіл, або фагоцитоз за допомогою макрофагів (Roitt I.M., Brostoff I., Male D.K. Immunology, Churchill Livingstone).

Виникнення клітинної імунної відповіді за допомогою пептидів, отриманих від білків, імуногенна дія яких невідомо, може бути піддано тестуванню, як це описано в Rivoltini і ін., 1995, або в Kawakami і ін., 1994a. Для цього потрібні Т-клітини, які здатні розпізнати потрібний пептид, якщо він поданий МНС-молекулами. У випадку наявності пептидів, які походять від пухлинних клітин, відповідні Т-клітини одержують з пухлинно-інфільтрованих лімфоцитів (TILs), як це описано в Kawakami і ін., 1994b; у випадку наявності чужорідних пептидів такі Т-клітини одержують аналогічно з периферійної крові. Т-клітини інкубують за допомогою клітинних ліній, наприклад, T2 (Alexander і ін., 1989) або RMA-S (Kagge й ін., 1986), змішаних із відповідним пептидом, і розчиняють їх, якщо мова йде про імуногенний пептид.

Ще одна можливість тестування зв'язаних із МНС пептидних кандидатів на їх імуногенність перебуває в дослідженні сполуки пептидів із Т2-клітинами. Такий тест заснований на особливості Т-2 клітин (Alexander і ін., 1989) або RMA-S-клітин (Kagge й ін., 1986) проявляти себе дефектно в TAP-пептидному механізмі переносу і представляти стабільно МНС-молекули тільки тоді, коли на них нанесені пептиди, подані в МНС-відповідності. Для тесту використовують, наприклад, Т-2 клітини або RMA-S-клітини, які стабільно переносяться за допомогою HLA-гена, наприклад HLA-A1-і/або HLA-A2-генами. Якщо клітини змішані з пептидами, що є хорошими HLA-лігандами, у той час як вони подані в HLA-відповідності, таким чином, що можуть бути пізнані імунною системою як чужорідні, такі пептиди сприяють тому, що HLA-молекули містяться на поверхні клітини в значній кількості. Визначення HLA на поверхні клітини, наприклад за допомогою моноклональних антитіл, дозволяє ідентифікувати відповідні пептиди (Malnati і ін., 1995; Sykulev і ін., 1994). У цьому випадку доцільно використовувати стандартний пептид із хорошою HLA-здатністю зв'язування.

Зважаючи на широку застосовність лікарської композиції згідно з винаходом, доцільно використовувати суміш декількох пептидів, кожний із яких може бути зв'язаний з іншою МНС-молекулою, переважно з одним

із двох або трьох МНС-підтипів, що найбільш часто зустрічаються. За допомогою вакцини на основі суміші пептидів, які можуть бути зв'язані з цими гаплотипами, може бути охоплене широке коло пацієнтів.

В реальному втіленні винаходу вакцина може містити великі послідовності пептидів. Застосовувані пептиди можуть в цьому випадку з одного боку відрізнятися тим, що вони зв'язані з різними HLA-підтипами. Цим досягається те, що охоплюються великі або усі без винятку HLA-підтипи одного пацієнта або великої групи пацієнтів.

Подальша, при відомих умовах, додаткова мінливість використовуваних пептидів може полягати в тому, що пептиди, зв'язані з певним HLA-підтипом, відрізняються щодо їх (не для HLA-сполук) визначальної послідовності, в той час як вони походять, наприклад, від різних білків тих же патогенних збудників або від різних збудників. Від такої мінливості може бути досягнуте посилення стимулювання імунної відповіді або імунізація проти різних збудників.

Кількість діючих пептидів у композиції згідно з винаходом може варіюватися в широкому діапазоні. Кількість пептидів залежить, зокрема, від роду застосування і відповідного формуляра. Кількість пептидів, що вводиться, повинна складати від порядку 10μг до порядку 5000μг на дозу, в цілому - від 1.0μг до порядку 1000μг, зокрема, від порядку 10μг до порядку 500μг. Уведення може проводитися одно- або багаторазово, при багатократному застосуванні доцільно обмежитися мінімум трихратним введенням. Зокрема, при терапевтичному використанні застосування може здійснюватися з інтервалами (наприклад, від 1 х у тиждень до 1 х на місяць) протягом будь-якого по тривалості проміжку часу, який залежить від специфічного імунного статусу пацієнта або перебігу хвороби.

Лікарська композиція, згідно з винаходом, може застосовуватися також *ex vivo*: принцип можливого застосування полягає в тому, що APCs, наприклад, дендритні клітини, культивують *ex vivo*, клітинну культуру інкубують із композицією згідно з винаходом, і APCs, які представляють пептид у МНС-відповідності, вводять пацієнту, що піддається лікуванню. Для цього варіанта застосування використовують відомі з бібліографічних джерел методи, наприклад, як описано в Porgador і Gilboa, 1995; Young і Inabe, 1996.

Допоміжний засіб, що міститься в композиції згідно з винаходом, має властивості полегшувати надходження пептидів у клітини або зв'язування пептиду з клітинами пацієнта і підсилювати імуногенність пептиду. Допоміжний засіб може, наприклад, щонайменше короткочасно робити проникними мембрани клітин, у які повинний потрапити пептид, щоб сприяти його проникненню в клітину. Може бути перевагою, але не обов'язково, щоб пептид був зв'язаний із допоміжним засобом, наприклад, через електростатичну взаємодію між електропроникним пептидом і полікатионним допоміжним засобом. Уведення пептиду в клітину може бути викликано тим, що пептид на підставі своєї просторової близькості до клітинної мембрани може кризь неї проникати, як тільки допоміжний засіб забезпечить її абсорбцію. Дія допоміжного засобу може бути заснована на тому, що вона збільшує критичну для проникнення в клітину концентрацію пептиду на поверхні клітини, або вона здійснює фагоцитоз або рідинне переміщення пептиду в клітину.

Є несподіваним те, що присутність допоміжного засобу підсилює не тільки проникнення пептиду в клітину, але й обумовлює посилення імуномодуляторної дії пептиду, яка може бути зведена до коректного пред'явлення пептиду через МНС-молекули.

У лікарській композиції можуть бути присутніми допоміжні засоби, а також практично всі мембранопроникні субстанції, які використовуються для переносу нуклеїнових кислот у клітини; у цьому зв'язку дається посилання на публікацію міжнародної заявки WO 93/19768, де приведені субстанції такого роду.

У кращій формі втілення винаходу допоміжний засіб являє собою основну поліамінокислоту або суміш основних поліамінокислот.

Ступінь полімеризації поліамінокислот може варіюватися в широкому діапазоні. Вона складає від порядку 5 до порядку 1000, зокрема, від порядку 15 до порядку 500.

Переважно в рамках запропонованого винаходу в якості допоміжного засобу використовують поліаргінін.

Іншим кращим допоміжним засобом у рамках запропонованого винаходу є полілізін.

Прикладами інших відповідних, зокрема, полікатионних органічних сполук (основних поліамінокислот) є поліорнітин, гістон, протамін, поліетиленімін або їх суміші.

Допоміжний засіб, при необхідності, може бути зв'язаний з клітинними лігандами, наприклад, із трансфертином, gp 120, LDL (низькощільний гіпопротеїн), α-фетуїном, EGF (фактор епідермального росту)-пептидами або з представником інших клітинних лігандів, які описані в міжнародній заявці WO 93/07283, для переносу ДНК за допомогою ендоцитозу, що рецепторно передається, вуглеводними залишками, наприклад, манозою або фукозою (ліганди для макрофагів) або антитілами (або їх фрагментами) замість білків на поверхні клітини. При необхідності, використовують полікатионні допоміжні засоби, наприклад, поліагрінін або полілізін, які при відомих умовах зв'язані з клітинними лігандами як складова частина комплексу з ДНК, наприклад, у формі плазмиду-ДНК.

ДНК може бути вільна від послідовностей, що кодують функціональні білки, у цьому випадку ДНК є пустим плазмідом.

У реальному втіленні винаходу ДНК містить послідовності, що кодують імуномодуляторні білки, зокрема, цитокін, наприклад, IL-2, інтерферон, GM-CSF.

Щоб досліджувати механізм переносу пептидів за допомогою основних поліамінокислот, у рамках запропонованого винаходу вимірюють виділення лактатдегідрогенази (LDH). У той час, як в оброблюваних поліаргінінових пробах концентрації виділених LDH практично не були виявлені, після інкубації з полілізином у клітинних надлишкових станах були виявлені високі концентрації LDH. Ці результати дозволяють зробити висновок, що вплив полілізину може бути зведений до проникності клітинної мембрани.

Не обмежуючись теорією можна сказати, що дія лікарської композиції згідно з винаходом полягає в

тому, що пептид за допомогою допоміжного засобу проникає в клітини, що представляють собою ціль, або зв'язується з клітинами, що зустрічаються в ендотермальному шарі шкіри. Цільовими клітинами можуть бути такі клітини, що представляють антиген, від яких пептид при відомих умовах після здійснення процесу може бути поданий В-і/або Т-клітинами. Прикладами цільових клітин є макрофаги, фібробласти, кератиноцити, клітини Лангеранса, дендритні клітини або β -клітини.

В рамках запропонованого винаходу було досліджувано, чи можуть маленькі пептиди в присутності основних поліамінокислот або глікозильованих форм полікатіонів бути прийняті в збільшеному об'ємі подібними макрофагам, що (представляють антиген клітинами (APCs). За результатами дослідження залишків цукру стало відомо, що вони приймаються макрофагами через опосередкований рецепторами ендоцитоз. Спостереження за APCs дозволило встановити, що вони являють собою *in vivo* (у живому організмі) тип клітин, який приймає пептиди і представляє їх іншим імунним клітинам. Результати дослідів *in vitro* (поза організмом), які показують, що APCs у присутності тестованих допоміжних засобів ендоцитують підвищену кількість пептидних антигенів, є посиленням на те, що ці допоміжні засоби здатні також *in vivo* (в організмі) підсилювати пред'явлення пептидів щодо цитотоксичних ефекторних клітин, а також викликати їх активування, що приводить до посилення імунної відповіді проти мішені, що міститься у вакцині.

В якості допоміжних засобів можуть бути використані також при відомих умовах додатково до згаданих вище допоміжних засобів компоненти у формі часток. Для часток підходять матеріали, які використовують для синтезу пептидів, наприклад, силікагель або штучна смола, оскільки вони є фізіологічно сприйнятливими і з них можливо одержати частинки, які досить малі для можливості проникнення в клітину. За допомогою допоміжних засобів у формі часток можна одержати високі локальні концентрації пептиду, що полегшує його "прийняття" клітиною.

Вид прийнятого допоміжного засобу, доцільність його модифікації за допомогою клітинних лігандів або додавання ДНК, а також необхідна кількість допоміжного засобу щодо пептиду можуть бути визначені емпірично, наприклад, довільно обране співвідношення пептиду до допоміжного засобу, (яке може принципово коливатися в широкому діапазоні), може бути визначене за допомогою титрування.

Випробування допоміжних засобів може здійснюватися в принципі тими ж методами, що і випробування пептидів, при відомих умовах у декілька етапів.

Здатність допоміжного засобу підвищувати зв'язування і/або проникнення всередину пептиду з APCs може бути виміряна, наприклад, на першому етапі, коли APCs інкубують із міченою флуоресцентною речовиною пептидами і допоміжним засобом. Обумовлене допоміжним засобом підвищене прийняття або зв'язування може бути визначене методом проточної цитометрії через порівняння з клітинами, які змішані тільки з пептидами.

На другому етапі випробовувані *in vitro* (поза організмом) допоміжні засоби можуть бути досліджувані на предмет того, чи впливає й у якому масштабі їх наявність у присутності пептиду на APCs, причому по описаним вище для випробування пептидів методам може бути виміряна МНС- концентрація на клітинах.

Наступна можливість для випробування ефективності допоміжного засобу полягає в застосуванні *in vitro* моделюючої системи. При цьому APCs інкубують разом із допоміжним засобом і пептидом і вимірюють відносне активування Т-клітинного клону, який специфічно розпізнає використовуваний пептид (Coligan 1991 Lopez 1993).

Ефективність формулювання може бути також доведена через клітинну імунну відповідь за допомогою підтвердження "затриманої надчутливості" (ВТН)-реакції у імунізованих тваринах.

На закінчення імуномодуляторну ефективність формулювання визначають у досліді над тваринами. Для цього можуть бути введені в дію також моделі пухлин відомими пептидними послідовностями, розпізнаваними по імунних клітинах. Вакцина, що містить пептид і допоміжний засіб, може застосовуватися в співвідношеннях, що варіюються, щодо пептиду до допоміжного засобу і загальної кількості. Ступінь захисту від росту пухлини є мірилом ефективності протипухлинної вакцини.

Лікарська композиція може прийматися парентерально, топічно, орально або локально. Переважно його застосовують парентерально, наприклад, підшкірно, внутрішньошкірно або внутрішньом'язово, переважно підшкірно або внутрішньошкірно, щоб насамперед досягти шкірних клітин (кератиноцити, фібробласти), дендритних клітин, клітин Лангеранса або макрофагів у якості клітин-мішеней. У рамках пухлинної терапії протипухлинна вакцина може застосовуватися також внутрішньопухлинно.

Композиція для парентерального застосування згідно з винаходом подана у вигляді розчину або суспензії пептидів і допоміжного засобу у фармацевтично відповідному носії, переважно водному носії. У якості водного носія можуть бути використані, наприклад, вода, буферна вода, сольовий розчин (0,4%), розчин гліцину (0,3%), гіалуронова кислота й аналогічні відомі носії. Крім водних носіїв можуть бути використані такі розчинники, як, наприклад, диметилсульфоксид, пропіленгліколь, диметилформамід і їх суміші. Композиція може, крім того, містити фармацевтично відповідні допоміжні речовини, наприклад, буферні речовини, а також неорганічні солі для досягнення нормального осмотичного тиску і/або ефективної ліофілізації. Прикладами такого роду добавок є солі натрію і калію, наприклад, хлориди і фосфати, сахароза, глюкоза, білкові гідролізати, декстран, полівінілпірролідон або поліетиленгліколь. Композиції можуть бути стабілізовані за допомогою традиційних прийомів, наприклад, за допомогою стерильної фільтрації. Композиція у цій формі може бути розфасована безпосередньо або ліофізована і перед уживанням змішана із стерильним розчином.

У реальному втіленні лікарська композиція згідно з винаходом подана у формі для топічного застосування, наприклад, для дермального або трансдермального застосування. Лікарська композиція може бути подана, наприклад, у вигляді гідрогелю на основі поліакрилової кислоти або поліакриламід (Dolobene®, Merckle), у вигляді мазі, наприклад, із поліетиленгліколем (PEG) в якості сприймаючого середовища, як, наприклад, стандартна мазь DA B 8 (50% PEG 300, 50% PEG 1500), або у вигляді емульсії, насамперед мікроемульсії на основі "вода в маслі" або "масло у воді" воді при необхідності з добавкою з ліпосом. В якості прискорювача проникання підходять, зокрема, похідні сульфоксиду, наприклад,

диметилсульфоксид або децилметисульфоксид, а також транскутол (дітиленглікольмоноетилефір) або циклодекстрини, піролідони, наприклад, 2-піролідон, N-метил-2-піролідон, 2-піролідон-5-карбонова кислота або N-(2-гидроксиетил)-2-піролідон, що біологічно розщеплюється, і їх складний ефір жирної кислоти, похідні карбаміду, як, наприклад, додецилкарбамід, 1,3-дидодецил карбамід і 1,3-дифенілкарбамід, терпени, наприклад, D-димони, ментон, карвол, лимонноксид або 1,8-синеол.

Іншими формами реального втілення є аерозолі, наприклад, для застосування в якості розпилення в ніс або для інгаляції.

Композиція згідно з винаходом може бути введена також за допомогою ліпосом, поданих у формі емульсій, піни, міцели, нерозчинних моношарів, фосфоліпідних дисперсій, шаруватих шарів і подібних їм речовин. Ці засоби, за допомогою яких вводять композицію, є сприймаючим середовищем для цілеспрямованої доставки пептидів до певної тканини, наприклад, лімфоїдної або пухлинної, або для збільшення часу напівобміну пептиду.

У випадку реального втілення композиції згідно з винаходом в локальній формі вона може містити також УФ-абсорбер, що при профілактичному застосуванні проти меланому вона діяла у той же час як засіб захисту від сонця.

Фахівець може вибрати відповідні допоміжні матеріали і форми з "ReMington's Pharmaceutical Sciences" 1990.

ПЕРЕЛІК КРЕСЛЕНЬ

Фіг.1: Вакцинування DBA/2 мишей проти мастоцитом P815 за допомогою пептиду KYQAVTTTL

Фіг.2: Вакцинування DBA/2 мишей проти мастоцитом P815 за допомогою пептиду SYFPEITHI

Фіг.3: Вакцинування DBA/2 мишей проти мастоцитом P815 за допомогою SYFPEITHI

Фіг.4: Вакцинування DBA/2 мишей проти меланому M-3 сумішшю пептидів

Фіг.5: Вакцинування DBA/2 мишей проти меланому M-3 топічним методом застосування ліків

Фіг.6: Вакцинування DBA/2 мишей проти меланому M-3 метастазів

Фіг.7: Лікування мишей, що мають M-3 мікрометастази, шляхом вакцинування сумішшю пептидів

Фіг.8: Опосередковане полілізином наповнення клітин тирозиназою

Фіг.9: Активування Т-клітин терапевтичної моделі після вакцинування (IFN- γ -виділення з клітин селезінки вакцинованих тварин як реакція на M-3-клітини)

Фіг.10: Індукція антивірусного імунітету за допомогою інфлуенцануклеокапсидпептиду ASNENMETM і фукозилізованого полілізіну в якості допоміжного засобу (CTL-активування)

Фіг.11: Посилення зв'язування пептидів із APCs за допомогою основних поліамінокислот

Фіг.12: Забезпечення проникності клітинної мембрани за допомогою основних поліамінокислот (LDH-виділення після обробки клітин полілізином або поліаргініном)

Фіг.13: Уведення поліаргініну всередину пептидів

Фіг.14: Переміщення пептидів із кісткового мозку в клітини, що представляють антиген

Фіг.15: Підвищення ефективності переміщення пептидів у клітини, що представляють антиген, за допомогою полікатіоноактивних поліамінокислот і гістонів

Фіг.16: Ефективність переміщення в залежності від ступеня полімеризації основних амінокислот

Фіг.17: Переміщення пептидів із поліаргінінами, що володіють низькою молекулярною вагою

Фіг.18: Вплив на ефективність переміщення в залежності від заряду пептиду

У наступних прикладах, якщо немає спеціальних вказівок, були використані такі матеріали і методики:

A) Клітини

a) клітинні лінії

Меланомні клітинні лінії мишей Cloudman S91 (Клон M-3; ATCC №CCL53.1), мастоцитомні клітинні лінії P815 (ATCC №T1B 64) і моноцито- макрофагові клітинні лінії P388D1 (ATCC T1B 63) одержують від ATCC. Клітини культивують у DMEM-середовищі з високим утримуванням глюкози ("High Glucose DM EM, life Technologies) із додаванням 10%FCS', 2mL - глутаміни і 20 μ g/ml гентаміцину. Клітини піддають звичайним випробуванням на відсутність зараження микоплазмой (PCR - Mycoplasma Detection Kit, Stratagene). Муринова клітинна лінія RMA/S (лімфома миші) описана в Катте й ін., 1986 і в Ljunggren і ін., 1990.

b) клітини з кісткового мозку, що представляють антиген.

Насамперед провівають стегові кістки DBA/2-мишей. Клітини кісткового мозку культивують у DMEM-середовищі з високим утримуванням глюкози з додаванням 10% FCS, 5% конячої сироватки, 2mM L-глуталіну і 20 μ g/ml гентаміцину в присутності 200одиниць/мл GM-CSF-миші (Li і ін., 1989; Genzyme Cambridge, MA, USA). Усі 24 години протягом перших п'ятьох днів заміни піддають дві третини середовища, щоб видалити не зв'язані з ним гранулоцити і В-клітини (Inaba і ін., 1992). Як зв'язані, так і вільні клітини збирають у проміжку між 8 і 10 днями в результаті інкубації з PBS/5 mM EDTA і при щільності 3x10⁴ клітин на гніздо висівають на предметне скло 8-гніздового мікроскопа (Nunc, Roskilde, Danemark). Більш 90% клітин виявляє позитивну реакцію з антитілом F4/80 (Endogen, Cambridge, MA, USA).

B) Синтез пептидів

Пептиди синтезують у пептидному синтезаторі (Модель 433A з Feedbackmonitor. Applied Biosystems, Foster City, Canada) при використанні TentaGel S PHB (Rapp, Tubingen) у якості жорсткої фази за Fmoc-методом (HBTU-активування Fastmoc™, масштаб 0.25mmol). Пептиди розчиняють у 1M TEAA, pH 7.3 і піддають очищенню методом зворотної хроматографії в Vydac C 18 - колоні. Послідовності підтверджують за допомогою мас-спектрометрії на MAT Lasemat (Firming, San Jose, Canada).

C) Перелік використовуваних пептидів

пептид	послідовність		Амінокислота	MHC-гаплотип
позначення			Нумерація в білку	
KPER 117	SYFPEITHI	Тирозин-кіназа JAK1	355-363	H2-Kd

КРЕР 118	KYQAVTTTL	Tum-P198	14-22	H2-Kd
КРЕР 162	GPPHSNNFGY	Tum-P358	4-13	H2-Dd
КРЕР 163	ISTQNHRAL	P91A	12-20	H2-Ld
КРЕР 164	LPYLGWLVF	P815	35-43	H2-Ld
КРЕР 143	RYAEDYEEL	trp-1		H2-Kd
КРЕР 145	PYLEQASRI	тирозиназа		H2-Kd
КРЕР 146	YYVSRDTLI	тирозиназа		H2-Kd
КРЕР150	YYSVKKTFL	trp-1		H2-Kd
	ASNENMETM	инфлуенца-		H2-Kb
		нуклеокапсид-пептид		

Пептидні суміші

Пептидна суміш 1 для М-3 протимеланомної вакцини: крер143, крер145, крер146, крер150.

Пептидна суміш 3 протимастоцитомної Р815 вакцини: крер117, крер118, крер162, крері63, крер164

D) Виготовлення вакцини

D1) Однопептидні вакцини

а) Для виготовлення однопептидної контрольної вакцини без допоміжного засобу беруть пептид у концентрації 1мг/мл у PBS. Інкубаційний період до моменту ін'єкції складає 4 години при кімнатній температурі.

б) Однопептидні вакцини з полілізином (якщо надалі не зазначено нічого іншого, використовують полілізин, довжина ланцюга якого дорівнює 200) у якості допоміжного засобу готують шляхом змішування пептиду і полілізину в зазначених кількостях у HBS. Інкубаційний період до моменту ін'єкції складає 4 години при кімнатній температурі.

і) Для одержання вакцини з утримуванням 16μг ефективного пептиду змішують 11.8μг полілізину з 160μг пептиду крері17 у загальному об'ємі в 1мл HBS.

ii) Для одержання вакцини з утримуванням 100μг ефективного пептиду змішують 74μг полілізину з 1мг пептиду крер117 у загальному об'ємі 1мл HBS.

с) Однопептидну контрольну вакцину з Incomplete Freund's Adjuvans (допоміжним засобом) (IFA) готують у результаті емульгування пептиду і IFA у зазначених кількостях. Інкубаційний період до моменту ін'єкції складає 30хв. при кімнатній температурі.

і) Для контрольної вакцини, що містить 16μг ефективного пептиду, емульгують 192μг пептиду крері 17 у 600μл HBS із 600μл IFA.

і) Для контрольної вакцини, що містить 100 μг ефективного пептиду, емульгують 1.2мг пептиду крері 17 у 600μл HBS із 600μл IFA.

D2) Пептидні суміші в якості вакцини

а) Пептидна суміш I у якості контрольної вакцини без допоміжного засобу з утримуванням 250μг кожного пептиду крері 43, крері45, крері 46, крері 50 у загальному об'ємі в 1мл PBS.

б) Пептидна суміш III у якості контрольної вакцини без допоміжного засобу з утримуванням 250μг кожного пептиду крері 17, крері 18, крері 62, крері 63, крері64 у загальному об'ємі в 1мл PBS.

с) Пептидну суміш у якості вакцини з полілізином у якості допоміжного засобу готують в результаті змішування 1мг пептидної суміші 1 (що містить 250μг кожного пептиду) із 74μг полілізину в HBS. Інкубаційний період до моменту ін'єкції складає 4 години при кімнатній температурі.

д) Пептидну суміш III у якості вакцини з полілізином, використовуваним як допоміжний засіб, готують у результаті змішування 1.25μг пептидної суміші 111 (що містить 250μг кожного пептиду) із 93μг полілізину з HBS. Інкубаційний період до моменту ін'єкції складає 4 години при кімнатній температурі.

е) Пептидну суміш I в якості контрольної вакцини з допоміжним засобом готують у результаті емульгування 1.2мг пептидної суміші I у 600μл HBS (з утримуванням 300μг кожного пептиду) із 600μл IFA. Інкубаційний період до моменту ін'єкції складає 30 хвилин при кімнатній температурі.

ф) Пептидну суміш III у якості контрольної вакцини з допоміжним засобом готують у результаті емульгування 1.5мг пептидної суміші III у 600μл HBS (з утримуванням 300μг кожного пептиду) із 600μл IFA. Інкубаційний період до моменту ін'єкції складає 30 хвилин при кімнатній температурі

г) Для топічного застосування з полілізином у якості допоміжного засобу інкубують 1мг пептидної суміші I (що містить 250μг кожного пептиду) із 74μг полілізину протягом 4 годин у загальному об'ємі в 400μл HBS. Отриману суміш додають у 1.6 гідрогелі DOLOVENE (Merckle).

h) Для топічного застосування контрольної вакцини без допоміжного засобу 1мг пептидної суміші I (що містить 250μг кожного пептиду) у загальному об'ємі в 200μл HBS додають у 1.8г гідрогелі DOLOVENE (Merckle).

і) Виготовлення зв'язаного з фукозою полілізину (довжина ланцюга: 240 або 220) здійснюють згідно з методом, описаним у MacBroom і ін.. 1992, причому досягається заміщення біля 40% (вихідні матеріали β-фукопіраносильфеніл-ізотіоціонат і полілізин одержують від SIGMA).

Ж) Якщо використовують кон'югати трансферин/полілізин (спосіб виготовлення описаний у міжнародній заявці WO 93/07283), кількість встановлюють таким чином, що абсолютна кількість полілізину складає 75μг на мкг пептиду. Якщо плазмідну ДНК (пустий плазмід рSP65, LPS-вільний, Boehringer Mannheim) інтегрують у комплексі, співвідношення складає 37.5μг DNA/75μг полілізину /1мг пептиду. У випадку використання 160μг замість 1мг пептиду кількість інших компонентів скорочують на той же коефіцієнт (6.25).

Е) Ін'єкція вакцини

Перед проведенням підшкірної ін'єкції мишей у групах до 8 тварин піддають анестезії в ізольованій повітряній камері. Після 3.5хв обробки галотаном (4 % у O₂, відсоток виділення 4) миші біля 1 хвилини

знаходяться під наркозом; у цей час підшкірно упорскують вакцину.

Внутрішньочеревну ін'єкцію проводять без попередньої анестезії. Об'єм ін'єкції кожної вакцини складає 100μл на тварину, що відповідає 100μл одиночного пептиду або пептидної суміші I на тварину. У випадку застосування пептидної суміші III кожній миші вводять 125μг загальної пептидної кількості.

F) Топічне застосування вакцини

На одну мишу беруть 200мг мазі, що містить 100μг пептиду або пептидної суміші I або 125μг пептидної суміші I. Мазь втирають у шкіру виголених тварин, а саме у всю поверхню спини й у вуха. Точну кількість мазі, що втирається, контролюють за допомогою ваг.

G) Застосування вакцини проти росту пухлини на мишах

Протокол випробування ефективності протиракової вакцини в профілактичних або терапевтичних цілях на мишах відповідає, якщо не було спеціальних вказівок, описаному в міжнародній заявці WO 94/21808 принципу, причому в якості мишиної моделі використовують DBA/2-модель.

Приклад 1

Вакцинування DBA/2 мишей проти мастоцитоми P815 160μг пептиду послідовності KYQAVTTTL (кпер118), отриманого від описаного в Lethe і ін., 1992 пухлинного антигену P815, ліганду Hg-iC.Змішують із 11.8μг полілізину 300 у 500μл HBS і інкубують протягом 4 годин при кімнатній температурі. Потім добавляють 500μл EBSS (Earl's буферний сольової розчин). По 100μл отриманої суміші вводять підшкірно восьми мишам із тижневим інтервалом. Після цієї попередньої імунації через тиждень з'являються пухлини, причому кожній миші контралатерально вводять 5×10^4 клітин мастоцитомної клітинної лінії P815 (ATCC Nr TIB 64; ці клітини експримують пухлинний антиген, від якого одержують пептид P815) у 100μл EBSS. Результат цього досліді поданий на Фіг.1 (зафарбовані квадрати).

У паралельно проведеному досліді змішують 200μг пептиду з 500μл HBS і потім емульгують із 500μл допоміжного засобу. Попередньої імунації (по 100μл отриманої емульсії) піддають вісім мишей, яким потім пересаджують за допомогою клітин P815 пухлини, як описано вище (Фіг.1: зафарбовані кружки).

Для проведення наступного рівнобіжного досліді клітинну протипухлинну вакцину готують таким чином:

160μг пептиду кпер118 змішують із 3μг трансферин-полілізину (Tfr), 10μг pL і 6μг плазмиду psp 65 (LPS-вільний) у 500μл HBS-буфера. Після 30 хвилин витримки при кімнатній температурі вищезгаданий розчин добавляють у склянку з 7.5×10^6 клітин алогенної фібробластової клітинної лінії N1HH3T3 (ATCC Nr CRL 1658) у 20μл DMEM-середовища (10% FCS, 20mM глюкози) і інкубують при 37°C. Через три години клітини змішують із 15мл свіжого середовища й інкубують протягом ночі при 37°C і 5% CO₂. За 4 години до застосування клітини опромінюють 20Gy. Готування вакцини здійснюють за способом, описаним в міжнародній заявці WO 94/21808. Попередню імунацію за допомогою цієї вакцини проводять із тижневим інтервалом в об'ємі 10^5 клітин. Через тиждень фіксують появу пухлини, як описано вище (Фіг.1 :зафарбовані трикутники). Виявлено, що вакцина, що містить пептид із полілізином, що найкраще захищає мишей від утворення пухлини.

Приклад 2

Вакцинування DBA/2 мишей проти мастоцитоми P815 за допомогою однопептидної вакцини

а) Три однопептидних вакцини, що містять або один пептид кпер117 у PBS (Фіг.2a), або пептид кпер117, емульгований у IFA (Фіг.2b), або пептид кпер117 із полілізином (довжина ланцюга 240) в якості допоміжного засобу (Фіг.2c) випробують на їх захисну дію проти появи P815-пухлини.

Вакцини готують за способом, описаним в розділі D. Об'єм ін'єкції складає щораз 100μл; ін'єкцію проводять підшкірно (sc) або внутрішньочеревинно (ip). Неін'єкційовані миші служать для негативного контролю, цілоклітинна вакцина, що складається із P815-клітин, що виділяють GM-CSF - для позитивного контролю (P815-GM-CSF; 10^5 клітин у 100μл на мишу були введені підшкірно). Кожна експериментальна група складається з восьми тварин, проводять три вакцинування (sc) з інтервалом у 7 днів. Через тиждень після останнього вакцинування тварини одержують контралатеральний пухлинний виклик від 5×10^4 P815-клітин. Тварини щодня піддають огляду, виникнення пухлин контролюють із тижневим інтервалом.

Пептид кпер117 із полілізином у якості допоміжного засобу виявляє кращий протипухлинний ефект при упорскуванні по 100μг на тварину підшкірно (захищеними опинилися три з восьми тварин). Цей ефект також хороший, як ефект, що досягається за допомогою цілоклітинної вакцини (захищеними опинилися чотири з восьми тварин). Упорскування 16μг пептиду з полілізином на одну тварину менш ефективний (захищеними опинилися дві тварини), але явно краще, ніж упорскування 100μг пептиду в PBS (Фіг.2a, відсутність захисного ефекту). Також пептид, емульгований у IFA, не дає того ефекту, що досягається в сполученні з полілізином (Фіг.2c).

б) У наступному експерименті на P815-мастоцитомних мишах порівнюють два немодифікованих полілізину з різною довжиною ланцюга: короткого, із 16 лізинових груп (pL 16) і довгого, із 240 груп (pL 240). Тваринам із контрольних груп упорскують від 100μг пептиду кпер117, розчиненого в PBS або емульгованого в IFA. Дві клітинні контрольні вакцини, що виділяють GM-CSF, використовують в якості позитивного контролю (vgl.a), причому одну вакцину одержують із стабільно стерпних P815-клітин, а друга вакцина - за допомогою швидкоплинного переміщення за методом (AVET), описаному в Wagner і ін., 1992. Обидві цілоклітинні вакцини забезпечують чотирьом-п'яти з восьми тварин захист. Вакцини на основі пептидів, що складаються з одного пептиду або з пептиду, емульгованого в IFA, не виявляють захисного ефекту: в усіх тваринах незабаром після появи пухлини остання починає розвиватися. Якщо, однак, застосовують пептид із полілізином, вакцина захищає тварин проти появи пухлини: дві з восьми тварин захищені, якщо використовують довгий полілізин (pL 240) і чотири з восьми тварин у випадку використання короткого полілізину. Ці результати, подані на Фіг.3, показують, що одиничний пептид у сполученні з полілізином в якості допоміжного засобу, викликає ефективний протипухлинний захист, порівнянний із захистом, забезпечуваним ефективною цілоклітинною вакциною, що виділяє цитокін, який у літературі фігурує в якості

стандарту при антипухлинному вакцинаванні (Dranof i in., 1993; Schmidt. I in. 1995).

Приклад 3

Вакцинування DBA2 мишей проти мастоцитомі Р815 за допомогою протипухлинної вакцини, що містить Р815-одичні пептиди або суміші Р815-пептидів. Для готування вакцини використовують такі пептиди:

крері 18 (100μг на ін'єкцію)

Пептидна суміш ІІІ (крерІІ7, крер118, крер162, крер163, крер164). Ця пептидна суміш містить усі донині відомі Р815-пептиди; за одну ін'єкцію вводять μг кожного пептиду.

В якості позитивного контролю використовують Р815-клітини, що виділяють GM-CSF.

У процесі попереднього випробування крері 17 виявляє себе як пептид із кращою захисною дією проти появи Р815-пухлини, якщо використовують 100μг пептиду разом із полілізином (7.5μг полілізіну /100μг пептиду у відповідності зі стандартним співвідношенням; полілізин: довжина ланцюга = 200). Незначна кількість (16μг) крер117 менш ефективна. У цьому прикладі вприскують по 100μг крер118 на тварину, а саме один раз тільки з полілізином (група В), один раз із трансферин-полілізином (група С) і один раз із трансферин-полілізином / ДНК (група D). В якості контролю використовують крері 18 з ІFA. В цьому експерименті один крерІІ8 не виявляє захисної дії проти появи пухлини.

У проведених в прикладі 4 дослідах показано, що вакцина, що містить пептидну суміш із меланомних пептидів, виявляє захисний ефект проти меланоми. Звідси в цьому прикладі було протестовано, чи підходить концепція пептидної суміші для Р815.

Пептидну суміш ІІІ застосовують один раз тільки з полілізином (група Е), один раз із трансферин-полілізином (група F) і один раз із трансферинполілізином / DNA (група G). В якості контролю використовують пептидну суміш ІІІ у ІFA. В якості негативного контролю використовують миші; в якості позитивного контролю - перенесені GM-CSF Р815 - клітини (10⁵ клітин на мишу).

Проведені в цьому прикладі досліди розроблялися, у порівнянні з іншими дослідями, нетипово: у групі позитивного контролю (GM-CSF клітини, що виділяють) в усіх тварин незабаром після появи пухлини відбувався її розвиток, причому велика частина цих пухлин також швидко зникала, як і з'являлася. Можливе пояснення цьому полягає в тому, що пухлина якийсь час розвивалася, перед тим, як вона була зруйнована. Інше можливе пояснення полягає в тому, що діагностоване як пухлина здуття виникало не від росту пухлини, а було сильним імуніклітинним інфільтратом (гранульомою). Тому що тварини не піддавалися розтину, причина не була остаточно встановлена; у всякому разі передбачували пухлини були зрештою знищені. Інший цікавий результат був отриманий у групі G, в якій тварини були піддані лікуванню за допомогою сполучення пептидної суміші ІІІ і полілізіну. В усіх тварин розвивалися пухлини, але в двох із усіх тварин розмір здуття (або імуніклітинного інфільтрату) був відносно незначним, не збільшувався і миші не виглядали нездоровими. Обидві ці тварини не були умертвлені і знаходилися під подальшим спостереженням. Несподівано через дев'ять тижнів після появи пухлини виявлена не була: результат дотепер не спостерігається. Дві з восьми тварин знищили зрештою свій пухлинний тягар. Знищення пухлин могло бути також пояснено вмістом крерІІ7 у пептидній суміші, що аналогічно прикладу 2, де два з восьми тварин були захищені за допомогою 16μг крері 17, і три з восьми тварин - за допомогою 100μг крер117. Захисний ефект міг, проте, бути викликаний більш ніж одним пептидом суміші.

Приклад 4

Захист DBA/2 мишей від меланоми М-3 шляхом попередньої імунізації за допомогою протипухлинної вакцини, що містить суміш пептидів.

Застосовують профілактичну вакцину, що містить суміш меланомних пептидів (пептидна суміш І, розділ D2).

Порядок проведення попередньої імунізації за допомогою вакцини, а також поява пухлини відповідає порядку, описаному в прикладі 2, із тією різницею, що появу пухлини визивають використанням М3-клітин (10⁵ клітин на тварину). В якості контрольної вакцини використовують цілюноклітинну вакцину з М-3-клітин, яка виділяє оптимальну кількість ІL-2 (1000-2000 одиниць на 10⁵ клітин) і виготовлена за способом, описаним в Schmidt i in., 1995. При обраних умовах випробувань ця вакцина дозволяє одержати 100%-ий захист (фіг.4). Чотирьом групам піддослідних тварин вводять вакцини з пептидною сумішшю. Дві групи одержують (або s.c або i.p) пептиди, емульговані в ІFA. Інші дві групи одержують (або s.c. або i.p.) пептиди разом із полілізином (pL 240).

Фіг.4 ілюструє захисний ефект пептидної вакцини з полілізином (pL240) в якості допоміжного засобу; 50% підданих лікуванню мишей були захищені від М-3 пухлинного виклику в порівнянні з непідданими лікуванню тваринами, у яких дуже швидко утворилися значні пухлини. Цей ефект міг бути досягнутий тільки при підшкірному упорскуванні пептидно-полілізинової вакцини або при нанесенні на шкіру гідрогелі (фіг.5). У трьох інших контрольних групах мишей, що піддавалися лікуванню за допомогою пептид/полілізинових вакцин i.p. або за допомогою пептидів у ІFA, вакцина була в основному неефективна. Передбачували пухлини не були відторгнуті і розвивалися, у порівнянні з пухлинами непідданих лікуванню контрольних тварин, із незначним уповільненням. Ці результати показують, що вакцина, що містить пептидну суміш, дозволяє досягти протипухлинного захисного ефекту, якщо вона містить полілізин. При обраних умовах випробувань ця пептидна вакцина була наполовину менш ефективна, ніж клітинна ІL-2-вакцина, що відповідно до повідомлень, що недавно з'явилися (Zatioukal, 1993, Zatioukal, 1995), захищає до 100% тварин від появи пухлини за рахунок використання 10⁵ живих М3-клітин.

Приклад 5

Захист DBA/2 мишей від М-3 метастазів

а) Застосовують терапевтичну вакцину, що містить суміш меланомних пептидів (пептидна суміш І, описана в розділі D2). Проводять три вакцинування (sc) із тижневим інтервалом. Перше вакцинування проводять через п'ять днів після появи метастазів; роблять щеплення проти п'ятиденних метастазів. 1.2x10⁴ М-3 клітин вводять для утворення метастазів; використовують технологію, описану в міжнародній

заявці WO 94/21808 і в Schmidt і ін., 1996.

В якості вакцини використовують пептидну суміш І: без допоміжного засобу (перміх 1 PBS), із IFA в якості допоміжного засобу (IFA перміх 1) або з фукозо-модифікованим полілізином (fpl перміх 1). Контрольні групи мишей не одержують ніякої вакцини (неін'єкційовані) або одержують приведену в прикладі 4 М-3-цільноклітинну вакцину, що виробляє IL-2. З фіг.6 видно, що кращий ступінь захисту був досягнутий у групі, в якій застосовувалася пептидна суміш І з фукозо-модифікованим полілізином в якості допоміжного засобу (фіг.6а). 50% мишей змогли відторгнути метастази (чотири миші з восьми). Цей спосіб лікування був навіть ефективніше, ніж спосіб застосування цільноклітинної вакцини, що дозволив захистити тільки 33% мишей (три з дев'яток). Застосування пептидно-І вакцини з IFA або без допоміжного засобу привело винятково до уповільнення приростання метастазів пухлини (фіг.6b).

б) У наступному експерименті на терапевтичній моделі досліджують захисний ефект вакцини, що містить пептидну суміш І і що вводиться підшкірно. Контрольні групи мишей одержують пептидну суміш у PBS (без допоміжного засобу) або з IFA. В якості допоміжного засобу використовують немодифікований полілізин 240. Крім того, в якості допоміжного засобу використовують фукозо-модифікований полілізин 200 (fpl 200). В якості контролю в цьому експерименті бере участь група тварин із IL-2 клітинною вакциною, що експримує. Як показано на фіг.7а, вакцина пептид/полілізин при лікуванні М3-метастазів виявилася ефективною. Характерна норма зцілення в цьому експерименті була досягнута лише при використанні фукозомодифікованого полілізину. При лікуванні таким способом 50% тварин відторгли метастази, що в порівнянні з застосуванням IL-2-вакцини, яка дозволяє в цьому випадку вилікувати 70% тварин, є хорошим результатом.

с) У наступному експерименті на терапевтичній моделі тестують, як зміни і модифікації відбиваються на протипухлинному ефекті. При цьому додатково до немодифікованого і до фукозо-модифікованого полілізину 200 тестують короткий немодифікований полілізин рL 16, довгий полілізин рL 450 і наступний полікатіон, а саме поліаргінін (pArg720). В якості позитивного контролю використовують клітинну М3-вакцину, що виділяє оптимальну кількість ($\geq 10^5$ клітин) GM-CSF (Schmidt, 1995). Також у цьому досліді контрольні групи містять пептидну суміш у IFA або без будь-якого допоміжного засобу. Як і в прикладі 5b) кращий ефект був досягнутий, якщо в якості допоміжного засобу був використаний фукозополілізин, фіг.7b. У цих групах 40% тварин відторгли метастази, у порівнянні з 30% у групі з використанням короткого полілізину рL 16. Крім групи, що одержали пептиди разом із поліаргініном, у тварин інших груп, яким була введена пептидна вакцина, було відзначено лише нетривале уповільнення при виникненні пухлин. Немодифікований поліаргінін був у цьому експерименті також ефективний, як фукозомодифікований полілізин, що привело до відторгнення метастазів у чотирьох тварин із десятих.

Фіг.7 ілюструє повторення цього обумовленого поліаргініном ефекту в незалежному експерименті. Тут також вакцинування за допомогою пептидної суміші в сполученні з поліаргініном дозволило досягти в чотирьох із восьми підданих лікуванню тварин протипухлинного ефекту.

Приклад 6

Наповнення клітин тирозиназою при використанні полілізину в якості допоміжного засобу.

Цей приклад служить в якості досліді, який показує, що полілізин як допоміжний засіб придатний для наповнення клітин великими фрагментами білка або цілих білків, причому в якості клітин були використані М-3-клітини, що заміщають.

Для наповнення клітин 160μg FITC-маркованої тирозинази (ЕС 1.14.18.1; сигма) змішують із 3μg полілізину (рL240) і протягом 3 годин інкубують при кімнатній температурі. Потім отриманий розчин поміщають у склянку з клітинною культурою Т75 з об'ємом 2×10^6 М-3 клітин і інкубують при температурі 37°C. Потім клітини були двічі промивають PBS, відокремлюють за допомогою PBS/2 mM EDTA і змішують із 1мл PBS/5 % FCS для проведення FACS-аналізу. Фіг.8 ілюструє наповнення М-3-клітин тирозиназою (ліва крива показує контроль, права - ступінь наповнення тирозиназою).

Приклад 7

Визначення активування Т-клітин після імунізації на терапевтичній моделі

Після того як вакцина пептид/полікатіон на терапевтичній моделі миші (див. приклад 5) однозначно продемонструвала свою ефективність, було досліджувано, чи веде цей спосіб лікування до активування Т-клітин. Для цього проводять секрецію цитокіну в якості маркера після інкубації клітин селезінки вакцинованих тварин із парентеральними М3-клітинами (Kawakami і ін., 1994b).

Готують одноклітинні суспензії селезінки вакцинованих і не підданих лікуванню тварин, що відбулося завдяки еритроцитомізу з гіпотонічним буфером (0.15 NH₄Cl, 1m KHCO₃, 0.1mM EDTA, pH 7.4). Зв'язані клітини видаляють, у той час як 3×10^6 клітин селезінки намл DMEM - середовища (10% FCS) інкубують у чашках Петри протягом 90 хвилин при температурі 37°C. Зв'язані клітини шляхом обережного добору за допомогою піпетки і спільного культивування з 1×10^3 парентальними клітинами культивують у різних кількісних співвідношеннях. Клітини культивують у 200μl DMEM-середовища (10% FCS), 2mM L-глутаміну і 20μg/ml гентаміцину в 96 гніздових плоскодонних чашках для тканинної культури. На дев'ятий день збирають 100 μl композиції і відповідний IFN-γ вміст заміряють із використанням комерційно придбаних комплектів ELISA-приборів (Endogen, Camdridge, MA, USA) згідно з інструкцією виробника. З'ясувалося, що після дев'ятиденної інкубації великі кількості IFN-γ (у середовищі тільки клітини селезінки вакцинованих тварин, у той час як у Спів-культурі клітин селезінки не підданих лікуванню тварин і М3-клітин практично не було виявлено IFN-γ. Результат цього експерименту поданий на Фіг.9.

Приклад 8

Індукція антивірусного імунітету за допомогою інфлюєнцануклеокапсид-пептиду ASNENMETM і фукозилізованого полілізину в якості допоміжного засобу. Вводять у дію вакцину, що містить на 1мг пептиду ASNENMETM 75μg fplys. Вакцину вводять шляхом разової ін'єкції, як зазначено в методичному розділі, причому на тварину приходить 100μg пептиду/7.5μg fphys. Для контролю проводять ін'єкцію 100 μg

одиначного пептиду (PBS) і відповідно не проводять ніякої ін'єкції (безін'єкційний контроль).

RMA-S мишині лімфомні клітини інкубують протягом ночі в безсироватковому середовищі при температурі 260°C с 10μг/мл пептиду ASNENMETM.

Через 10 днів після вакцинування клітини селезінки вакцинованих тварин ізолюють, змішують із наповненими пептидом RMA-S-клітинами в співвідношенні 5:1 і культивують протягом ще п'ятих днів (Stuber і ін., 1994). Визначають число уцілілих діючих клітин селезінки в різних культурах. Потім для визначення CTL-активності за допомогою стандартного 4-х годинного дослідження на виділення європію (Blomberg і ін., 1993), клітини змішують у різних співвідношеннях із RMA-S клітинами, які раніше розбавляють пептидом ASNENMETM і внутрішньокмплексною сполукою європію. Як ілюструє Фіг.10 специфічний імунітет у цьому експерименті був досягнутий тільки завдяки вакцинуванню з пептидом і pLys, але не у випадку, якщо був введений один пептид.

Приклад 9

Випробування різних основних поліамінокислот на їх здатність підсилювати проникання всередину і/або зв'язування пептидів із APCs

Для реалізації цих випробувань проводять флуоресцентні дослідження: модель пептидного антигену послідовності LFEAIEGFI (MCH Kd - обмежені) позначають флуоресцентним барвником Fluorescein isothiocyanate (FITC) згідно з інструкцією виробника (Molecular Probes). Прийом або зв'язування позначеного FITC пептиду одного (імпульсне) або разом із різними концентраціями основних амінокислот (полілізін із довжиною ланцюга від 16 до 490, поліаргінін із довжиною ланцюга від 15 до 720) через MHC Kd-обмежену моноцито- макрофагову клітинну лінію P388D1 визначають методом проточної цитометрії. Для цього 1×10^5 P388D1 клітин інкубують у кінцевому об'ємі 1мл середовища (DMEM/10 % FCS) у трубках центрифуги з 5μг FITC-міченого пептиду одного або із сумішшю пептиду і поліамінокислот протягом 30 хвилин при температурі 37°C, а потім інтенсивно промивають, щоб видалити незв'язаний пептид. Поліамінокислоти додають у концентрації 50, 25, 12, 6 і 3μг на мол. середовища, що містить 5μг FITC-міченого пептиду. Порівнюють відносну флуоресцентну інтенсивність різних випробувань, щоб оцінити ефективність прийому і/або зв'язування пептиду. Результат цих випробувань поданий на Фіг.11; випробування проводять відповідно з 25μг pL450 або PArg450. При обраних умовах поліаргінін проявив себе майже в п'ять разів ефективніше, ніж полілізін.

Приклад 10

Дослідження механізму, за допомогою якого APCs приймають пептиди Пептиди можуть бути прийняті APCs за допомогою специфічних механізмів, таких як, наприклад, макропіноцитоз або рецепторно опосередкований ендцитоз (Lanzavecchia, 1996). Альтернативний механізм полягає в тому, що поліамінокислоти можуть робити клітинну мембрану проникною й у такий спосіб сприяють дифузії пептидів із середовища в цитоплазму.

а) Чи стала клітинна мембрана проникною перевіряють шляхом виміру виділення цитоплазматичного ферменту лактатдегідрогенази (LDH) після інкубації P388D1-клітин із поліамінокислотами (полілізін або поліаргінін) при ізотонічних умовах із використанням наявних у продажі приладових комплектів (Cytotox 96, Promega, Madison, Wisconsin, USA) згідно з інструкцією виробника. На підставі приведених на Фіг.12b результатів можна припустити - дія pLys полягає в тому, що він робить клітинну мембрану проникною, що проявляється у високих концентраціях цитоплазматичного ферменту, що виділяється при ізотонічних умовах. На противагу цьому після використання pArg (Фіг.12b) LDH практично не виявляється. При порівнянні проб із використанням тільки поліамінокислот і проб із використанням сумішей полілізіну або поліаргініну з пептидом не було встановлено різниць у виділенні LDH. Після інкубації тільки з пептидом не було виявлено вимірної LDH-активності.

б) Чи відбулося проникнення всередину мічених FITC-пептидів у присутності або при відсутності основних поліамінокислот досліджують на підставі опублікованого Midoux і ін., 1993 принципу. Від клітин частинки, що попали всередину, переносяться до ендосомів. У порівнянні з цитоплазмою або середовищем клітинної культури нейтральні рН-величини показують, що ці органели з розміром рН порядку 5 - кислі. Емітована FITC флуоресценція дуже залежить від рН. У середовищі з рН-умовами, як вони є наявними у ендосомах, флуоресценція подавлена. Звідси мічені FITC-пептиди, які від клітин передаються ендосомами, показують зменшену флуоресценцію. При додаванні монензину низьке рН-значення ендосом нейтралізується, що веде до вимірної посиленої флуоресценції мічених FITC пептидів, що попали всередину.

Клітини інкубують із сумішшю з поліаргініну (середній розмір молекулярної ваги 100.000, довжина ланцюга 490) і флуоресцентно міченого пептиду при температурі 4°C або 37°C. Число інкубованих при 37°C проб зберігають і перед проточно-цитометричним аналізом при температурі 4°C обробляють 50μM монензином.

Це дозволяє виявити, що інкубовані APCs із певними основними амінокислотами, наприклад, полілізином (pLys) і поліаргініном (pArg) підсилює прийом або зв'язування пептиду з APCs.

Як впливає з Фіг.13, у клітинах, оброблених тільки пептидом або з монензином, спостерігається незначне збільшення флуоресценції. У протилежність цьому, флуоресцентні сигнали в пробах, оброблених монензином і сумішшю з поліаргініну і пептиду, були сильно збільшені. Прийому пептидів не спостерігалось, якщо проби були інкубовані при 4°C. Характерне збільшення флуоресценції після обробки монензином указує на те, що викликана pArg наповнюваність приводить до акумулювання пептидів у везикулах усередині клітин (Midoux і ін., 1993; Фіг.13). Як і очікувалося, після обробки монензином наповнених полілізином проб спостерігається незначне збільшення флуоресценції. Наповнення полілізином при 4°C обумовило збільшення флуоресценції, що вимірюється, що є подальшою вказівкою на те, що дія полілізіну зводиться, головним чином до проникності клітинних мембран (Фіг.12b).

Приклад 11

Дослідження наповнення APCs короткими пептидами

APCs, виділені з кісткового мозку і збережені за допомогою GM-CSF, досліджують комбінацією флуоресцентно міченого пептиду з полілізином (pL200; SIGMA) або тільки пептидом методом флуоресцентної мікроскопії. Для виявлення прийому пептидів за допомогою мікроскопа на предметне скло висівають APCs і інкубують із 40μг флуоресцентно міченого пептиду LFEAIEGFI або із сумішшю з 50 цг/мл полілізину (pL200) і 40μг пептиду LFEAIEGFI протягом 30 хвилин при температурі 37°C. Після ретельного промивання клітини фіксують 4%-им параформальдегідом, покривають антизнебарвником (Dako, Glostrup, Denmark) і флуоресцентно мікроскопійовані (Zeiss). Ядра офарблюють у контрастні кольори за допомогою 4,6-діамедино-2-феніліндолу (DAPI, SIGMA). Як показано на флуоресцентній мікрофотографії, Фіг.14, клітини, інкубовані з пептидом і полілізином (А), у порівнянні з клітинами, обробленими тільки пептидом (В), виявляють явно підвищений ступінь прийому пептидів. У той час як флуоресценція оброблених тільки пептидом (імпульсна) клітин виявляється вибірково й у формі частинок, інтенсивна флуоресценція оброблених у присутності полілізину і пептиду клітин виявляється не локалізовано і рівномірніше розподілена по клітині.

Приклад 12

Кількісне визначення наповнення клітин пептидом методом проточної цитометрії

а) Після того, як у результаті проведених згідно з прикладом 11 дослідів, було показано, що APCs є для наповнення маленькими пептидами чудовими клітинами-цільми, *in vitro* (поза організмом) проводять FACS-випробування з метою ідентифікувати підходящі для пептидної вакцини допоміжні засоби. Це дослідження уможливило швидке кількісне випробування флуоресцентно мічених пептидів; в якості пептидної моделі використовується пептид послідовності LFEAIEGFI. У цих дослідів в якості APCs використовують мишині клітинні лінії P388D1. 1×10^6 клітин у кінцевому об'ємі в 1мл DMEM-середовища з високим утриманням глюкози і 10% FCS інкубують протягом 30 хвилин при 37°C з 5μг пептиду з флуоресцентною кінцевою концентрацією в 5ммоль/мл. Клітини обробляють або тільки пептидами, або комбінацією пептиду з полікатіонами або пептиду з гістонами при зростаючій концентрації (від 3 до 50μг/мл), як показано на фіг.15. Використовують такі сполуки: А: поліорнітин (середній діапазон молекулярної ваги 110,000 довжина ланцюга 580); В: насичений аргініном гістон; С: насичений лізином гістон; D: поліаргінін (середній діапазон молекулярної ваги 100,000, довжина ланцюга 490); Е: полілізін (середній діапазон молекулярної ваги 94,000, довжина ланцюга 450). У попередніх випробуваннях було встановлено, що інкубаційний період у 30 хвилин виявив максимальний ступінь прийому пептидів. Більш тривалий період обробки (4-8 годин) не виявив характерного посилення флуоресцентного сигналу. Перед проведенням аналізу клітини були 5х промиті великим об'ємом PBS, що містить 0.2% BSA. Клітини в 1мл крижаного PBS/0.2% BSA були знову сприйняті і досліджували методом проточної цитометрії (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Поліаргінін і полілізін виявляють себе самими ефективними допоміжними засобами; поліорнітин виявляє при обраних умовах цитотоксичний ефект. Посилення прийому пептидів, завдяки поліаргінину і полілізину, співвідноситься з концентрацією (Фіг.15d, e); ступінь прийому зростає відповідно до довжини ланцюга (Фіг.16).

Виявлено, що поліаргінін із збільшенням у 0,3 рази щодо контрольного розміру виявляє більш широкий відповідний діапазон концентрації, ніж полілізін, що показує максимальне збільшення менше ніж у 0,2 рази, і що поліаргінін при усіх використовуваних довжинах ланцюга для переносу білків ефективніше, ніж полілізін (Фіг.16): поліаргінін уможливує ефективний перенос при таких низьких концентраціях, як 3μг/мл, у той час як для полілізину необхідні концентрації 25μг/мл, щоб викликати характерне збільшення флуоресценції (Фіг.15 d, e).

Щоб установити, чи існує при переносі пептидів нижня границя довжини ланцюга, синтезують поліаргініни різної довжини ланцюга (10-30 груп) і досліджують на їх здатність підвищувати перенос пептидів при високих концентраціях полікатіонів (Фіг.17). Для цих дослідів використовують пептид LFEAIEGFI, випробовувані полімери поліаргінину вводять у дію в концентрації 100μг/мол.

Навіть незначне збільшення переносу пептидів було виявлено вже при самому короткому випробуваному поліаргініні.

с) Основні амінокислоти - це позитивно заряджені молекули. Звідси можна припустити, що негативно заряджені пептиди за допомогою електростатичної взаємодії можуть зв'язуватися з цими полікатіонами, що, можливо, приводить до посиленого прийому пептидів. Щоб перевірити цю гіпотезу, була співставлена здатність катіоноактивних поліамінокислот приймати короткі пептиди в залежності від їх заряду в РЗ 8 8D1-клітинах. У наступній таблиці подані використовувані негативно заряджені пептиди, які відповідають всім умовам, необхідним для МНС-1-сполуки (Rammen-see і ін., 1995). Пептид 1 отриманий від TRP миші (протеїн із родини тирозинази), пептид 2 - від інфлуенца гемаглютиніну (Schmidt і ін., 1996), пептид 3 - від тирозинази миші, пептид 4 - від Р 198 пухлинного антигену, пептид 5 - від бетагалактозидази (Gavin і ін., 1993). (Mr відноситься до діапазону молекулярної ваги, "fluor" - до флуоресценції).

Таблиця

Послідовність	Mr	Mr fluor	заряд	заряд +fluor
YAEDYEEL	1031	1389	4 x негативний	6 x позитивний
LFEAIEGFI	1038	1396	2 x негативний	4 x позитивний
IFMNGTMSQV	1127	1485	нейтральний	2 x негативний
KYQAVTTTL	1024	1382	1 x позитивний	1 x негативний
TRHPARIGL	961	1319	2 x позитивний	нейтральний

На підставі методів, застосовуваних для мічення пептиду флуоресцином, уведено два негативних заряди. Було виявлено, що після інкубації з поліаргініном пептиди (5ммоль на пробу) із найвищим числом

негативних зарядів ефективніше усього переносяться в Р388D1 - клітини. Це вказує на те, що іонна взаємодія між пептидом і полікатіоном підсилює перенос пептидів у клітини (Фіг.18). Проте в порівнянні з клітинами, що були оброблені тільки пептидом, також і у випадку використання нейтральних пептидів у присутності полікатіонів були прийняті великі кількості. Обробка тільки пептидом дозволила виявити в усіх випробовуваних пептидах майже ідентичні флуоресцентні сигнали; на підставі викладеного на Фіг.18 у якості "тільки пептиду" показаний флуоресцентний сигнал як такий, що заміщає, отриманий за допомогою пептиду LFEAIEGFI.

ЛІТЕРАТУРА

- Alexander, J. и др., 1989, Immunogenetics 29, стр.380
Alired, D.C. и др., 1992, журнал Clin. Onkol 10 (4), стр.599-605
Avrameas, A. И др., 1996, Европейский журнал Immunol. 26, стр. 394-400
Behr, J.P., 1994, Bioconjug-Chem., сентябрь-октябрь 5 (5), стр. 382-9
Bertoletti, A. и др., 1994, Nature, 369,407-410
Biologic Therapy of Cancer, редакторы: DeVita V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown
Blomberg, K. und Ulfstedt, A.C., 1993, журнал Immunol. Methods 160: стр. 27-34
Boon, T., 1992, Adv Cancer Res 58, стр. 177-210
Boon, T., 1993, Спектр науки (Mai), стр. 58-66
Boon, T. и др., 1994, Annu. Rev. Immunol. 12, стр.337-65
Boon, T. und van der Bruggen, P., 1996, журнал Exp med 183, стр.725-729
Braciale, T.J. und Braciale V.L., 1991, Immunol. Today, стр.124-129
Brocke, S., и др., 1996, Nature 379 (6563), стр. 343-346
Bronte, и др., 1995, журнал Immunol. 154, стр. 5282
Carrel, S. und Johnson, J.P., 1993, Current Opinion in Oncology 5, 383-389
Coligan, J.E., и др., 1991, Nature 351, стр. 290-296
Coligan, J.E., и др., 1991, Current Prot. In Immunol., Wiley, New York
Coulie, P.G. и др., 1992, Int. журнал Cancer, 50, стр. 289-297
Coulie, P.G. и др., 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92, стр., 7976-80
Coulie, P.G. и др., 1994, журнал Exp. Med. 180, стр. 35-42
Cox, A.H. и др., 1994, Science 264, 5159, стр.716-9
Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Herausgeber: Ausubel F.M. John Wiley и Sons, Inc.
Dranoff, G. и др., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 90, стр. 3539-3543
Dranoff, G. und Mulligan, R.C., 1995 Advances in Immunology 58, стр. 417
Falk, K. и др., 1991, Nature 351, стр. 290-296
Feigner, J.H. и др., 1994, журнал Diol.Chem. 269, стр. 2550-2561
Feltkamp, M.C. и др. 1995, Eur. журнал Immunol. 25 (9), стр. 2638-2642
Fenton, R.G. и др.1993, журнал Natl. Cancer Inst. 85,16, стр.1294-302
Fisk, B. и др., 1995, журнал Exp. Med. 1881, стр. 2109-2117
Flow Cytometry, Acad, Press, Methods in Cell Biology, 1989, Vol. 33, авторы: Darzynkiewicz, Z. Und Crissman, Y.A.
GeddeDahl, T. 1992, Hum Immunol. 33,4, 266-74
Grohmann, U. 1995, Eur. Immunol. 25, 2797-2802
Guarini, A. 1995, Cytokines and Molecular Therapy 1, 57064
Han, X.K. 1995, PNAS 92,9747-9752
Handbuch: FACS Vantage™ User's Guide, April 1994, Becton Dickinson
Handbuch: CELL Quest™ Software User's Guide, June 1994, Becton Dickinson
Henderson, R.A., und Finn, O.J., 1996 Advances in Immunology 62, 217-256
Herin M. и др., 1987, Int. журнал Cancer, 39, стр.390
Hock, H. и др., 1993, Cancer Research 53, стр. 714-716
Houbiers, J.G. и др. 993, Eur. журнал Immunol 23, стр. 2072-7
Huang, A.Y.C., und Pardoll D.M. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, стр. 9730-5
Inaba, K., и др., 1992, урнал Exp. Med. 176, стр. 1693-1702
Jung, S. и др., 1991, журнал Exp. Med. 173, 1,273-6
Kawakami, Y. и др., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, стр. 6458-62
Kawakami, Y. и др., 1994a, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9, стр. 3515-9
Kawakami, Y. и др., 1994b, журнал Exp. Med. 180,1, стр. 347-52
Kawakami, Y. и др., 1995, журнал Immunol. 154, стр.3961-3968
Karre, K. и др., 1986, Nature 319,20. Feb., стр. 675
Kersh, G.J. и др., 1996, Nature 380 (6574), стр. 495-498
Kovacsovic Bankowski, M. Und Rock, K.L., 1995, Science 267, стр. 243-246
Lanzavecchia, A., 1996, Curr.Opin. Immunol.. 8, стр. 348-354
Lehmann, J.M. и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, стр. 9891-9895
Lethe, B. И др., 1992, Eur. журнал Immunol. 22, стр. 2283-2286
Li, H. и др., 1989, журнал Exp. Med. 169, стр. 973-986
Lill, N.L., Tevethia, M.J., Hendrickson, W.G., und Tevethia, S.S. (1992). журнал Exp. Med. 176, стр. 449-57
Ljunggren, H.G., и др., 1990, Nature 346, стр. 476-480
Loeffler, J.-P. и др., 1993, Methods Enzymol. 217, стр. 599-618
Lopez, J.A. и др., 1993, Eur. журнал Immunol. 23, стр. 217-223
MacBroom, C.R. и др., 1972, Nath. EnzymoL28, стр. 212-219

Mackiewicz, A. и др., 1995, Human Gene Therapy 6, стр. 805-811

Malnati, M.S. и др., 1995, Science 267, стр.1016-1018

Mandelboira, O. и др., 1994, Nature 369, 5 may, стр.67-71

Mabdelboim, O. и др., 1995, Nature Meticine 1,11, стр. 1179-1183

Marchand, M., и др., 1995, Int журнал Cancer 63, стр. 883-5

McIntyre, C.A. и др., 1996, Cancer Immunol. Immunother. 42, стр. 246-250

Midoux, P., и др., 1993, NATO ASI Series H67, стр. 49-64

Morishita, R., и др., 1993, журнал Clin. Invest. 91,6, стр. 2580-5

Nabel, G.J., и др., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, стр. 11307-11311

Noguchi, Y., и др., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. YSA 91, стр. 3171-3175

Oettgen, H.F. und Old, L.J., 1991, Biologic Therapy of Cancer, редакторы: De Vita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag, J.B., Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown, стр. 87-119

Ostrand-Rosenberg, S., 1994, Current Opinion in Immunology 6, стр. 722-727

Pardoll, D.M., 1993, Immunology Today 14,6, стр. 310

Practical Immunology, редакторы Leslie Hudson and Frank C Hay, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne

Peace, D.J., и др., 1991, журнал Immunol. 146,6, стр. 2059-65

Peoples, G.E. и др., 1994, журнал Immunol. 152,10, стр. 4993-9

Plautz, G.E. и др., 1993, Proc. Natl. Acad.Sci. USA 90, стр. 4645-4649

Porgador, A., Gilboa, E., 1995, журнал Exp. Med. 182, стр. 255-260

Puccetti, P. и др., 1995, Eur. журнал Immunol. 24, стр. 1446-1452

Rammensee, H.G., и др., 1993, Annu.Rev Immunol 11, стр. 213-44

Rammensee, H.G., и др., 1993, Current Opinion in Immunology 5, стр. 35-44

Rammensee, H.G., и др., 1995, Current Biology 7, стр. 85-96

Rammensee, H.G., и др., 1998, Current Opinion in Immunology 7, стр. 85-96

Rammensee, H.G., и др., 1995, Immunogenetics 41, стр.178-228

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18,Auflage 1990, Mack Publishing Company, Easton, Penn. 1990

Remy, J.S. и др. 1994, Bioconjug-Chem., Nov-Dec, 5 (6), стр. 647-54

Rennie, J. und Rusting, R., 1996, Scientific American September, стр. 28-30

Rivoltini, L. И др., 1995, журнал Immunology 154, 5, стр. 2257-2265

Robbins, P.F., и др., 1994, Cancer Res 54, стр. 3124-6

Robbins, P.F., и др., 1995, журнал Immunol 154, стр. 5944-50

Robbins, P.E. und Rosenberg, S.A., 1996, журнал Exp. Med. 183, стр.1185-92

Robbins, P.E. und Kawakami, Y., 1996, Curr Opin Immunol 8, стр. 628-638

Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. Immunology, Churchill Livingstone

Rosenberg, S.A., 1996, Annual Reviews of Medicine, 47, стр.481-491

Ryser, H.J. und Hancock, R., 1965, Science 150, стр.501-503

Ryser, H.J. und Shtn, W.C., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, стр.3867-3870

Schmidt, W., и др., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, стр.4711-4714

Schmidt, W., и др., 1996, Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 93, стр. 9759-63

Sette, A., и др. 1994, Moï. Immunol. 31 (11), стр. 813-822

Shen, W.C. und Ryser, H.J., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, стр.1872-1876

Shen, W.C. und Ryser, H.J., 1989, Moï. Pharmacol. 16, стр. 614-622

Shen, W.C. und Ryser, H.J., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 78, стр. 7589-7593

Skipper, J., und Stauss, H.J., 1993, журнал Exp. Med. 177, 5, стр.1493-8

Slingluff, C.L. и др., 1994, Current Opinion in Immunology 6, стр.73-740

Stein, D. и др., 1994, журнал EMBO, 13,6, стр.1331-40

Stuber, G., и др., 1994, Eur. журнал Immunol 24, стр. 765-768

Sykulev, Y. и др., 1994, Immunity 1, стр. 15-52

Theobald, M., Levine, A.J., und Sherman L.A. (1995) PNAS 92, стр. 11993-7

Tibbets, L.M., и др., 1993, Cancer, Jan. 15, Vol.71,2, стр. 315-321

Tykocinski, M.X., и др., 1996, Am. журнал Pathol. 148, стр.1-16

Van der Braggen, P., и др., 1994, Eur. журнал Immunol. 24, 9, стр. 2134-40 Issn: 0014-2980

Van der Eynde, B. und Brichard, V.G., 1995, Current Opinion Immunol. 7, стр. 674-81

Van Pel, A. und Boon, T., 1982, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79, стр. 4718-4722

Van Pel, A. и др., 1995, Immunological Reviews 145, стр. 229-250

Vitiello, A., и др., 1995, журнал Clin. Inv. 95,1, стр. 341-349

Wagner, E., и др., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, стр. 341—4

Wagner, E. и др., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, стр. 6099-103

Wang, R.F., и др., 1995, журнал Exp. Med. 181, стр. 799-804

Weynants, P. и др., 1994, Int. журнал Cancer 56, стр. 826-829

Widmann, C. и др., 1992, журнал Immunol. Vethods 155 (1), стр. 95-99

Wolfel, T. и др., 1994 a), Int. журнал Cancer 57, стр. 413-418

Wolfel, T. и др., 1994 b), Eur. журнал Immunol. 24, стр. 759-764

York, L.A. und Rock, K.L., 1996, Ann. Rev. Immunol. 14, стр. 369-396

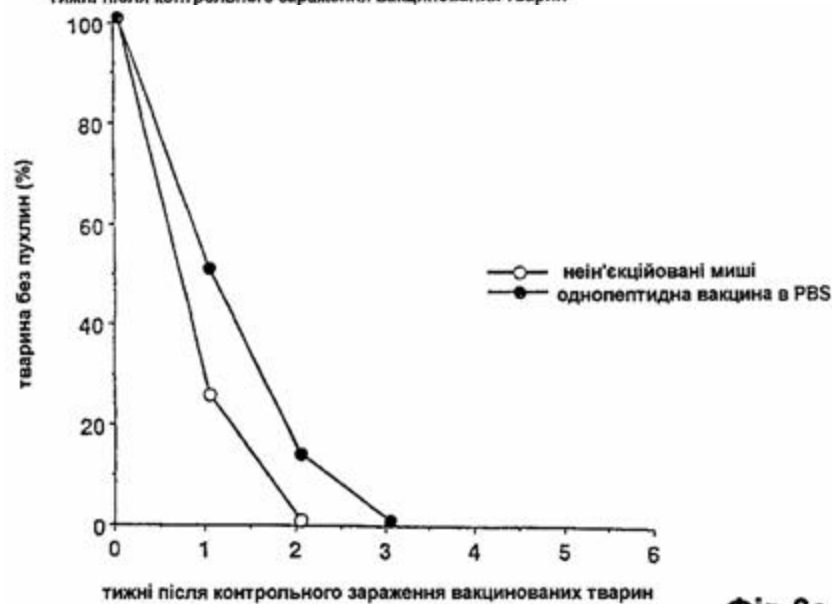
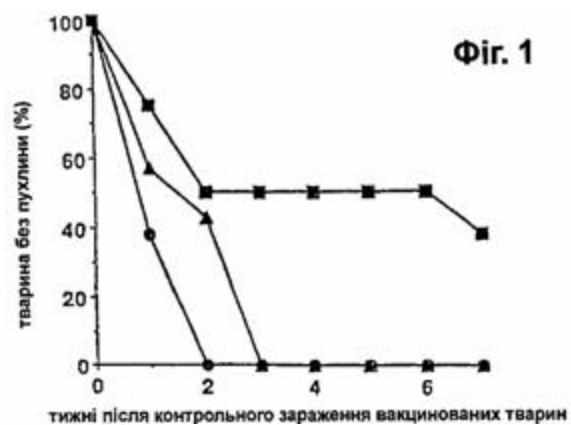
Yoshino, I. и др., 1994 a), журнал Immunol. 152, 5, стр. 2393-400

Yoshino, I. и др., 1994 b), Cancer Res., 54,13, стр.3387-90

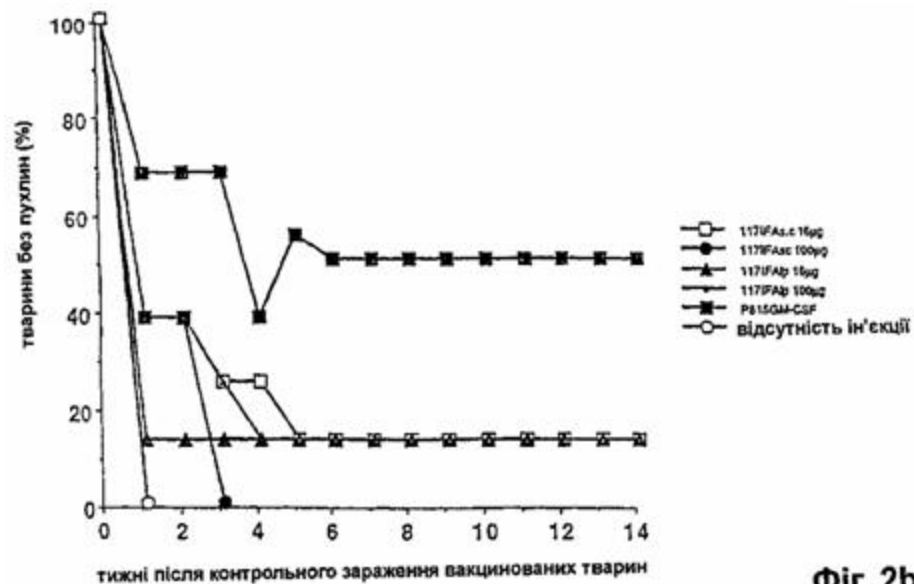
Young, J.W., Inaba, K., 1996, журнал Exp. Med., 183, стр. 7-11

Zatloukal, K. и др. 1993, Gene 135, стр. 199-20

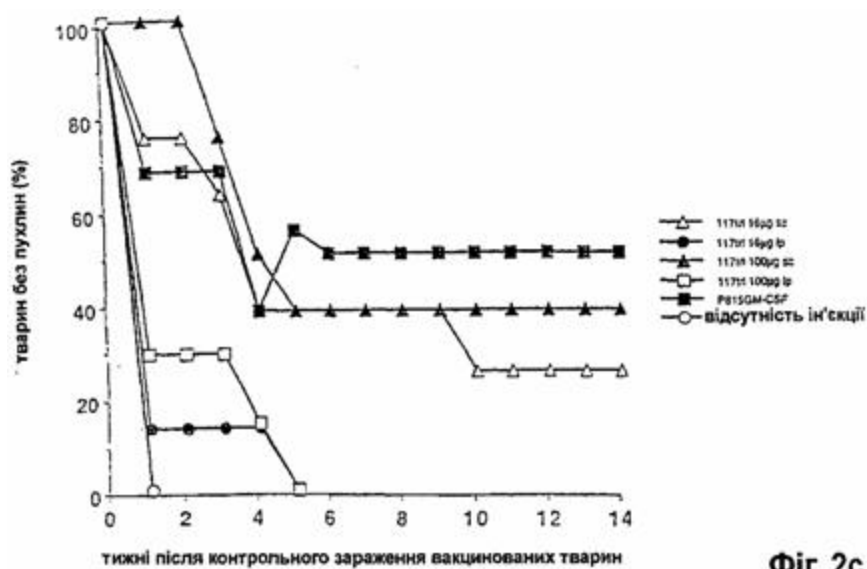
Zatloukal, K. и др. 1995, журнал Immun. 154, стр. 3406-3419



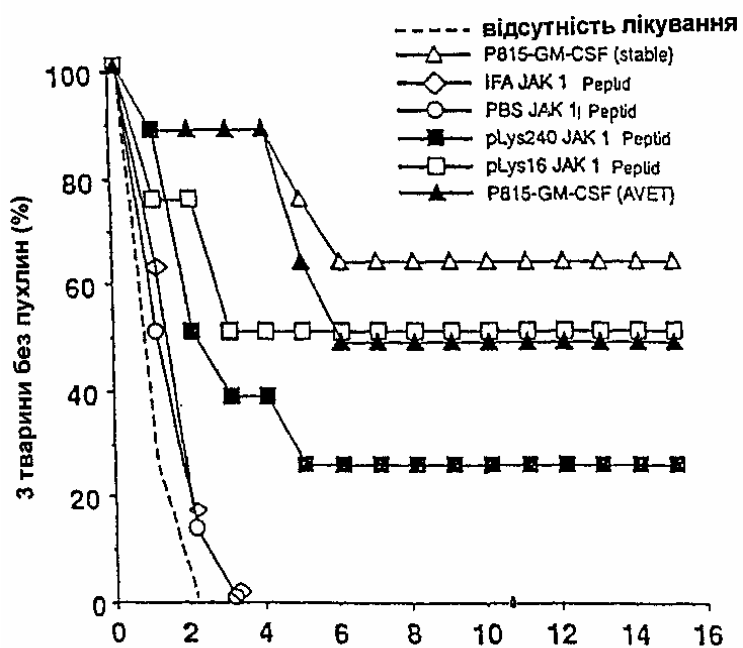
Фіг. 2a



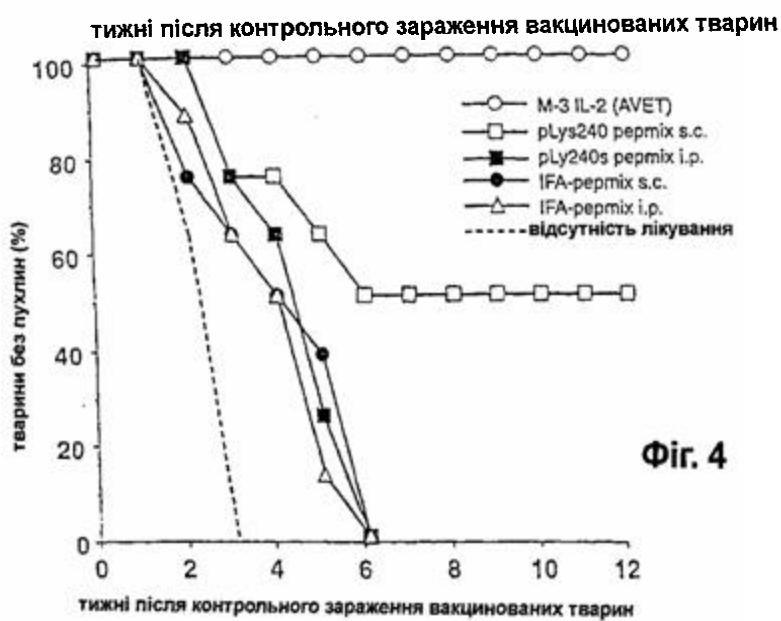
Фіг. 2b



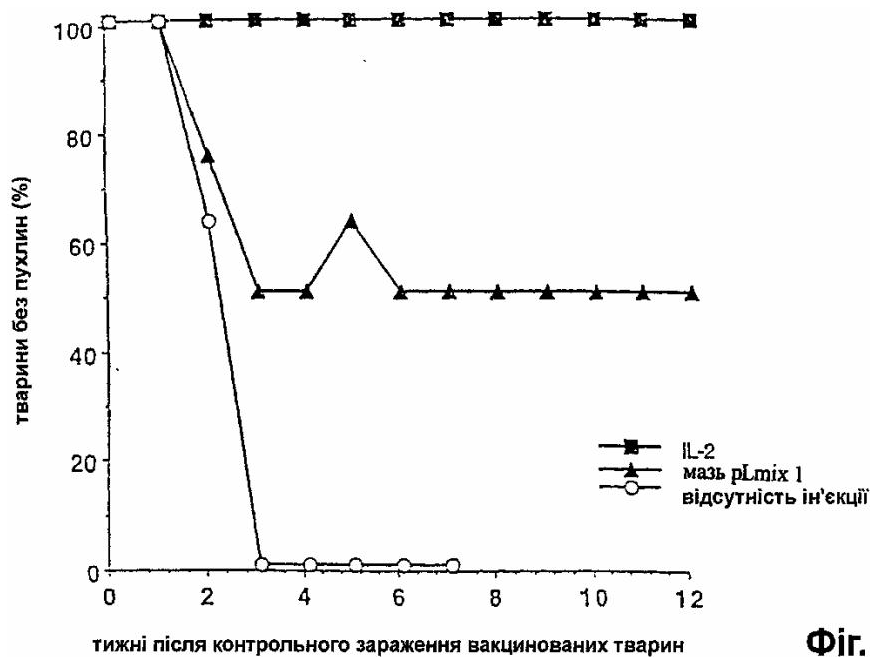
Фіг. 2с



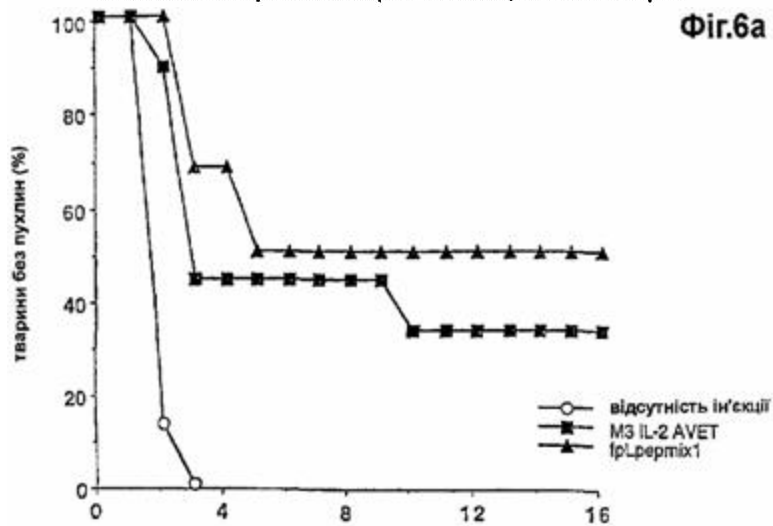
Фіг. 3



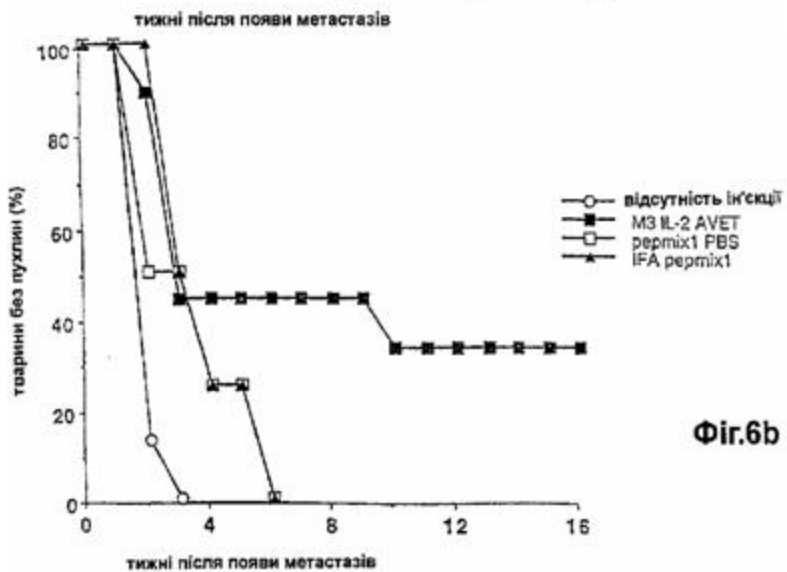
Фіг. 4



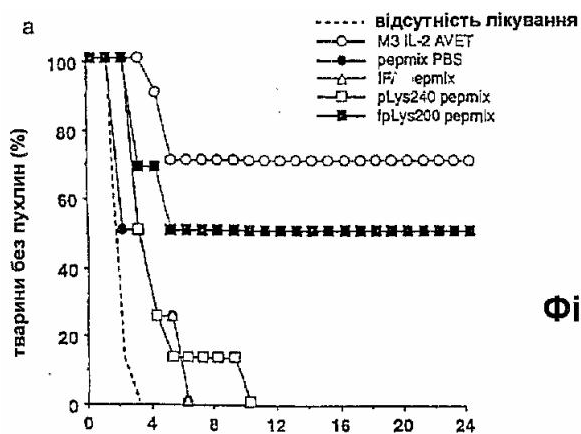
Фіг. 5



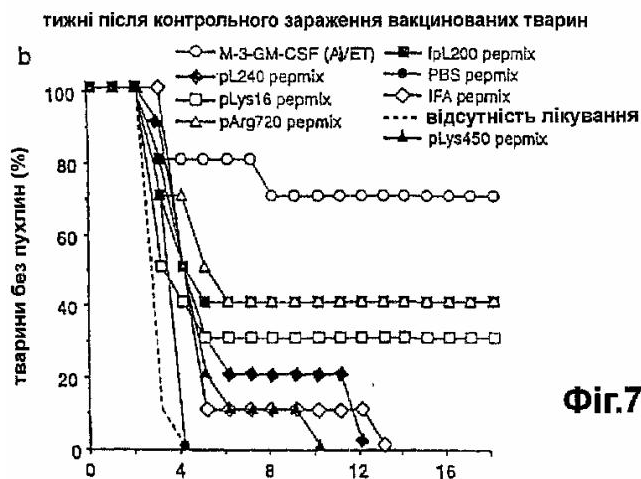
Фіг.6a



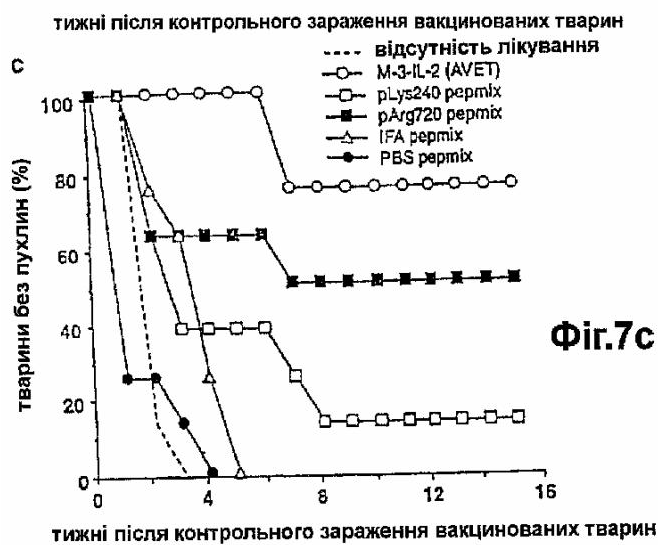
Фіг.6b



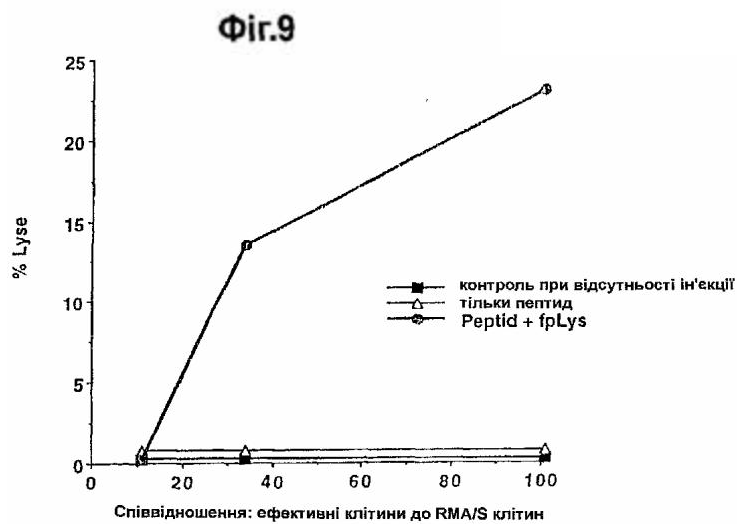
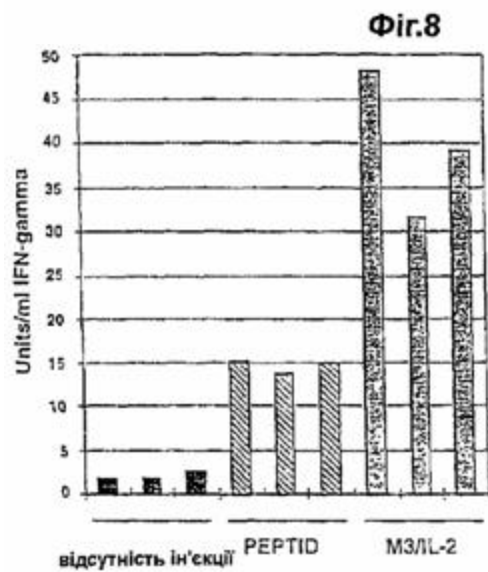
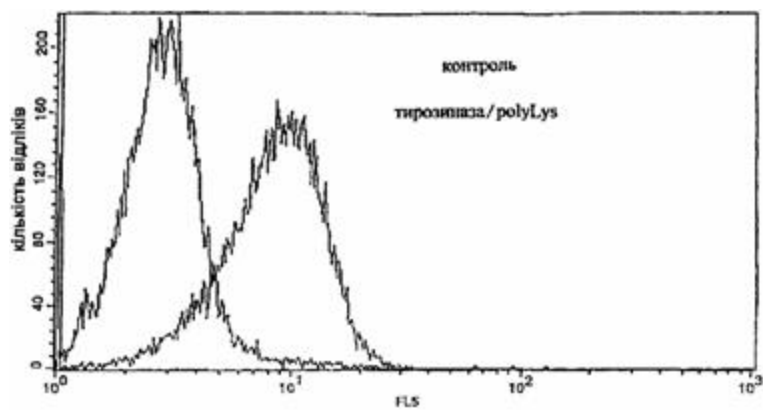
Фіг.7а



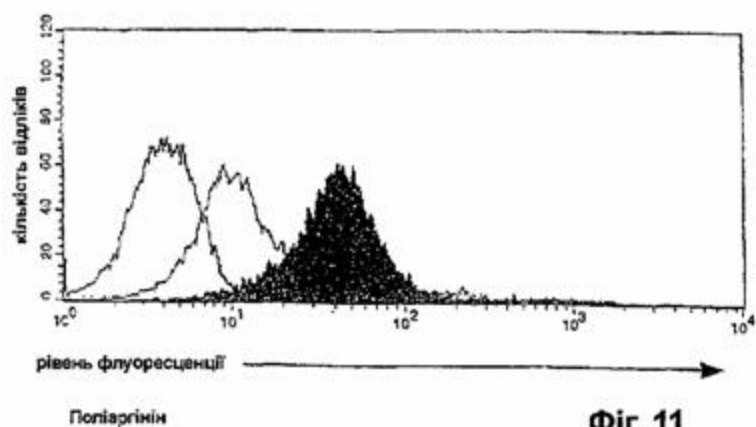
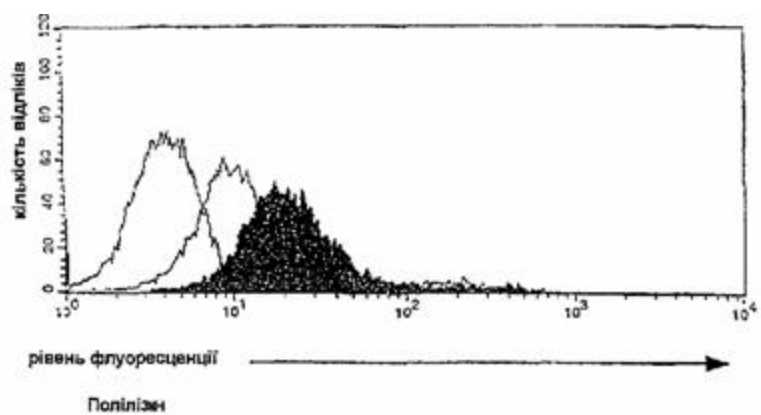
Фіг.7b



Фіг.7с

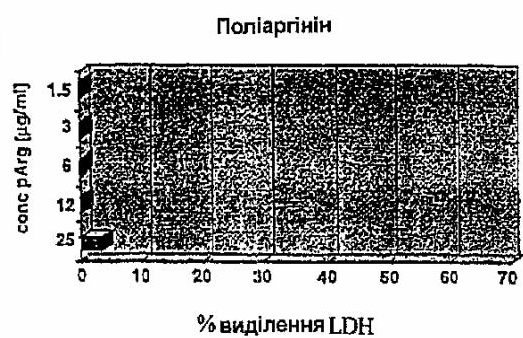


Фіг. 10

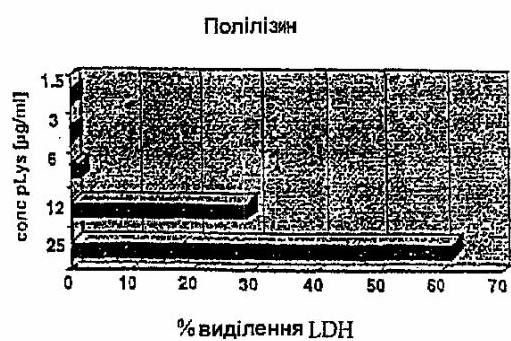


Фіг. 11

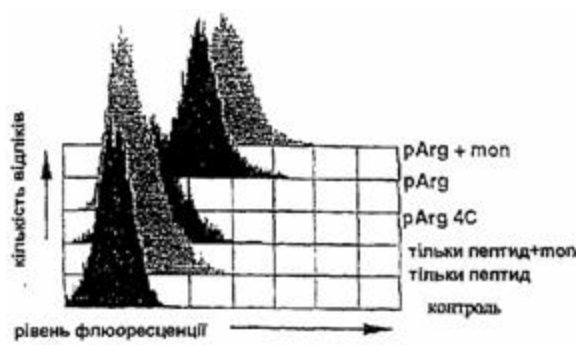
A



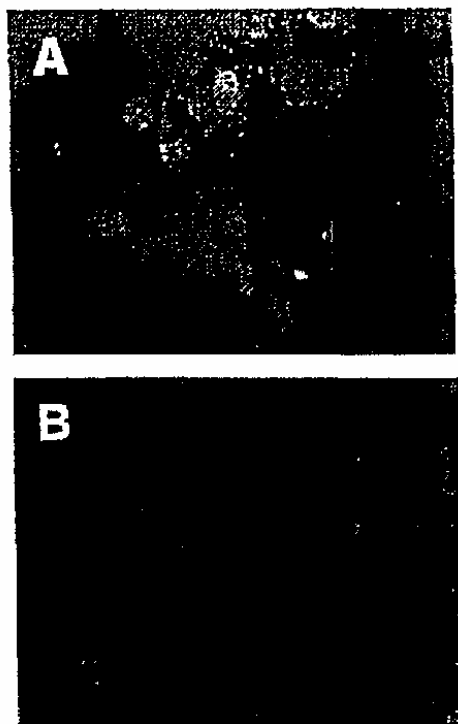
B



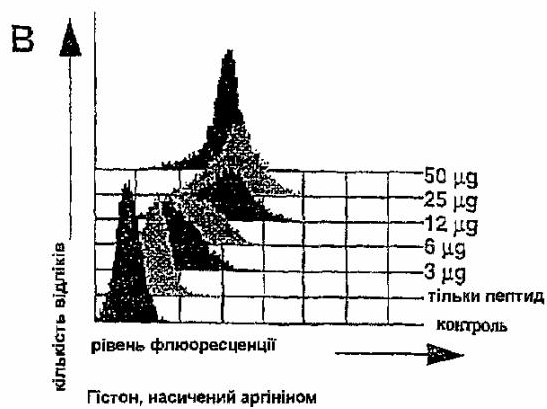
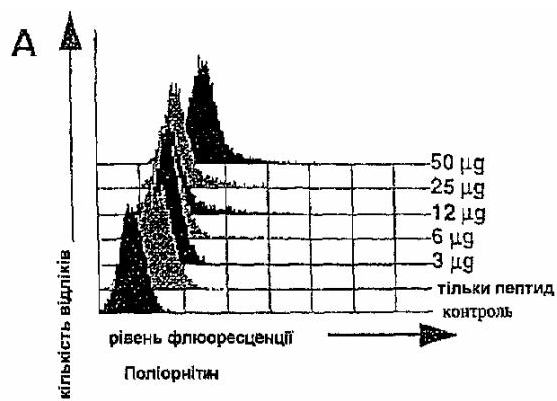
Фіг. 12



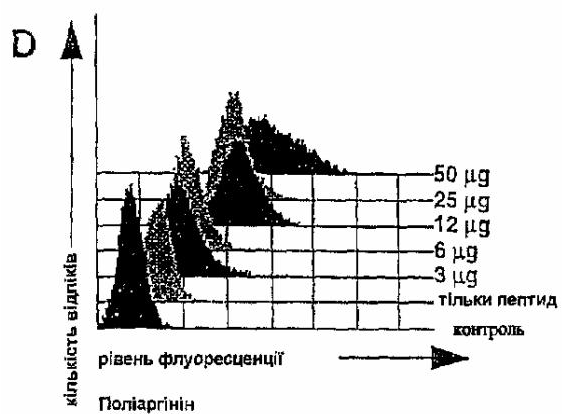
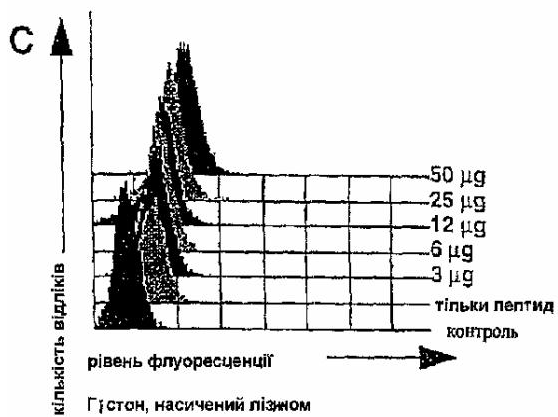
Фиг. 13



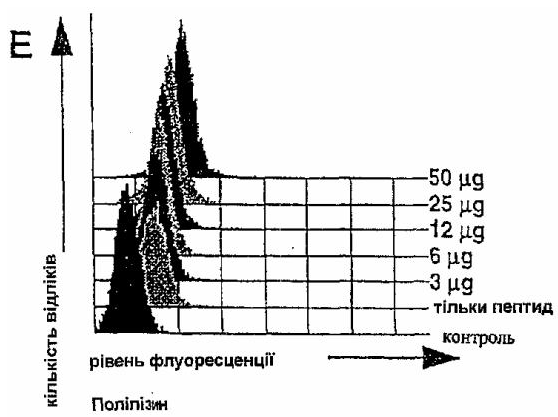
Фиг. 14



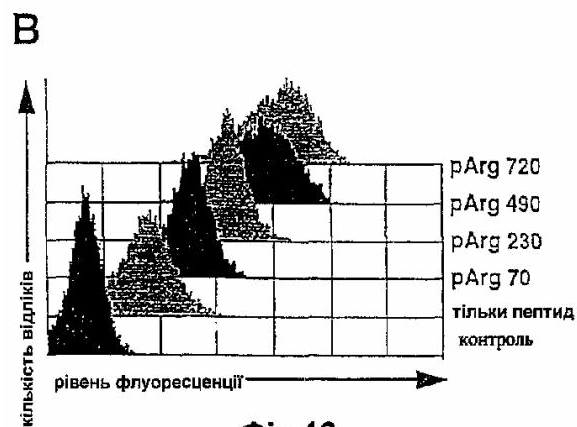
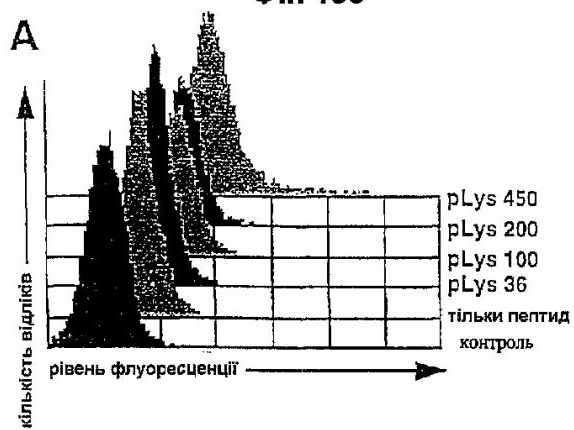
Фіг. 15a



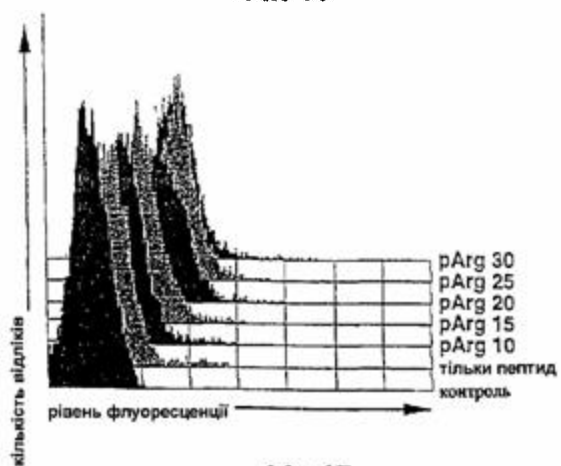
Фіг. 15b



Фіг. 15с



Фіг. 16



Фіг. 17

